

Entwicklung elektrochemischer Biosensoren für die Tumordiagnostik

Von der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und
Psychologie der Universität Leipzig genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Dipl. Biochem. Anja Steude

geboren am 25.06.1984 in Eilenburg

Dekan: Prof. Dr. Andrea A. Robitzki

Gutachter: Prof. Dr. Andrea A. Robitzki

Prof. Dr. Joachim Wegener

Tag der Verteidigung 11.01.2013

„Wissenschaft wird von Menschen gemacht.“

(Werner Heisenberg 1901-1976)

Dipl. Biochem. Anja Steude

Entwicklung elektrochemischer Biosensoren für die Tumordiagnostik

Dissertation

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie (Universität Leipzig)

213 Seiten, 165 Literaturangaben, 59 Abbildungen, 15 Tabellen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Entwicklung und Anwendung elektrochemischer Biosensoren zur Erweiterung oder zum Ersatz herkömmlicher Diagnostikverfahren. Als Basis für die Biosensoren wurden Elektrodenarraychips entworfen und im Reinraum gefertigt. Die als 9WPtE bezeichneten Elektrodenarrays waren aus 3×3 Elektrodenpaaren im 96-well-Maßstab (ANSI-Standard) aufgebaut. Jedes Elektrodenpaar bestand aus einer kreisrunden Arbeitselektrode mit einem Durchmesser von 1,9 mm und einer Gegenelektrode als offenem Kreisring um die Arbeitselektrode mit einem Durchmesser von 7 mm. Außerhalb des Reinraums wurden separate Messkammern und Ag/AgCl-Referenzelektroden integriert.

Sowohl das Referenzsystem als auch die Signalqualität der 9WPtE-Elektrodenarraychips wurden mittels Zyklovoltammetrie, Impedanzspektroskopie und Rasterkraftmikroskopie analysiert und anhand dieser Untersuchungen optimiert. Das Augenmerk lag hierbei auf den Produktionsprozessen zur Herstellung der Elektrodenarraychips, auf den Elektrolytbedingungen für die elektrochemischen Messungen und auf der Recyclebarkeit der Chips. Die Funktionalisierung der Arbeitselektroden der 9WPtE-Chips erfolgte mit sich selbst-organisierenden Schichten aus Thiolen. An die Thiole wurden mittels Chemoligation die biologischen Erkennungskomponenten kovalent gekoppelt.

Mit dem 9WPtE-Elektrodenarray wurde auf diese Weise ein funktionsfähiger kompetitiver Immunosensoren gegen den Tumormarker Tenascin C entwickelt. Außerdem wurden der 9WPtE-Chip und ein zusätzlich entwickelter Durchflusssensor, basierend auf dem Prinzip des 9WPtE, genutzt, um die Möglichkeit der Detektion ganzer eukaryotischer Zellen zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Gleichungsverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Biosensoren	1
1.1.1 Biologische Erkennungselemente	2
1.1.1.1 Biokomplex-bildende Erkennungselemente	3
1.1.1.2 Biokatalytische Erkennungselemente	6
1.1.2 Signalwandler	7
1.2 Zyklovoltammetrie	9
1.3 Elektrochemische Impedanzspektroskopie	12
1.4 Kopplung von Proteinen an die Signalwandler	18
1.5 Signalverstärkung für elektrochemische Biosensoren	20
1.6 Tumormarker Tenascin C als Analyt für die biosensorische Diagnostik	20
1.7 DCC-Rezeptor als Zelloberflächenprotein für die Detektion ganzer Zellen . . .	22
1.8 Zielsetzung für die Doktorarbeit	22
2 Material	24
2.1 Antikörper	24
2.2 Chemikalien	25
2.3 Enzyme	27
2.4 Geräte	27
2.5 Kits	29
2.6 Metalle	29
2.7 Puffer und Lösungen	29
2.8 Software	30

2.9	Verbrauchsmaterialien	31
3	Methoden	33
3.1	Zellkulturtechnik	33
3.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	33
3.1.2	Ernte von eukaryotischen Zelllinien	34
3.1.3	Proteinexpressionsanalyse mittels Immundetektion	35
3.1.3.1	<i>Western Blot</i>	35
3.1.3.2	<i>Dot Blot</i>	37
3.1.3.3	Immunzytochemie	38
3.2	Herstellung des 9WPtE-Elektrodenarraychips	39
3.2.1	Fertigungsschritte im Reinraum	39
3.2.2	Integration von Messkammern und Referenzelektroden	48
3.3	Herstellung des Sensorobjektträgers	48
3.3.1	Fertigungsschritte im Reinraum	48
3.3.2	Kontaktierung der Elektroden und Integration einer Durchflusskammer und einer Referenzelektrode	51
3.4	Bestimmung der Rauigkeit von Elektrodenoberflächen mittels Rasterkraftmi- kroskopie	51
3.5	Elektrochemische Messungen	52
3.5.1	Messlösung	52
3.5.2	Messaufbau für den 9WPtE-Elektrodenarraychip	52
3.5.3	Messaufbau für den Sensorobjektträger	52
3.5.4	Zyklovoltammetrie	53
3.5.4.1	Zyklovoltammetrische Charakterisierung der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid	53
3.5.5	Impedanzspektroskopie	53
3.5.5.1	Datenanalyse und -modellierung mittels Ersatzschaltbild	54
3.6	Funktionalisierung der Goldarbeitselektroden	56
3.6.1	Selbstorganisation von Thiolen auf den Goldarbeitselektroden	56
3.6.2	Kovalente Bindung von Proteinen und Antikörpern an MUDA-SAMs	56
3.6.3	Signalverstärkung mittels Präzipitatisfällung katalysiert durch Peroxidase	57
3.7	Biosensorische Detektion von Tenascin C	58
3.7.1	Indirekte Detektion von Tenascin C	58
3.7.2	<i>Sandwich</i> -Verfahren zur Detektion von Tenascin C	58
3.7.3	Kompetitive biosensorische Detektion von Tenascin C	59
3.8	Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln	60

3.8.1	Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip	60
3.8.2	Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem Sensorobjektträger	60
3.9	Biosensorische Detektion von HEK293 _{DCC-eCFP} -Zellen mit dem Sensorobjektträger	61
3.10	Recycling der Elektroden	62
3.11	Statistik	62
4	Ergebnisse	64
4.1	Fertigung der 9WPtE-Elektrodenarraychips im <i>Lift-off</i> -Verfahren	64
4.2	Fertigung von Referenzelektroden	66
4.3	Aufbau des Messsystems	67
4.4	Charakterisierung der Referenzelektroden	67
4.4.1	Empirische Bestimmung der optimalen KCl-Konzentration	68
4.4.1.1	Zyklovoltammetrie	68
4.4.1.2	Impedanzspektroskopie	71
4.4.2	Berechnung des Redoxpotentials der Referenzelektrode	78
4.4.3	Empirische Bestimmung der optimalen Ferri-/Ferrocyanidkonzentration	83
4.4.3.1	Zyklovoltammetrie	83
4.4.3.2	Impedanzspektroskopie	85
4.5	Charakterisierung der 9WPtE-Elektrodenarraychips	89
4.5.1	Optimierung der Fertigungsprozesse	89
4.5.1.1	Wahl des optimalen Sputterverfahrens zum Aufbringen der Metallschichten	89
4.5.1.2	Wahl des optimalen Haftvermittlers für die Chipfertigung	92
4.5.1.3	Einsatz des Isolierungslacks SU8	96
4.5.2	Reproduzierbarkeit der Impedanzmessungen	101
4.5.3	Recycling der 9WPtE-Elektrodenarraychips	107
4.5.3.1	Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Oberflächentopographie	107
4.5.3.2	Zyklovoltammetrie	108
4.5.3.3	Impedanzspektroskopie	109
4.6	Herstellung und Charakterisierung von funktionalen Oberflächen	111
4.6.1	Aufbau von sich selbst-organisierenden Monoschichten (SAMs) aus Thiolen	112
4.6.1.1	Zyklovoltammetrie	113
4.6.1.2	Impedanzspektroskopie	115

4.6.2	Stabilität von kovalent immobilisierten Antikörpern auf MUDA-SAMs	118
4.7	Biosensorische Detektion von Tenascin C	121
4.7.1	Indirekte Detektion von Tenascin C	121
4.7.2	<i>Sandwich</i> -Verfahren zur Detektion von Tenascin C	123
4.7.3	Kompetitive biosensorische Detektion von Tenascin C	124
4.7.3.1	Konzentrationsabhängige Detektion von TnC mit dem kompetitiven Biosensor	126
4.8	Biosensorische Detektion von ganzen Zellen	128
4.8.1	Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip	129
4.8.1.1	Fluoreszenzmikroskopie	129
4.8.1.2	Impedanzspektroskopie	130
4.8.2	Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem Sensorobjektträger in einem Durchflusssystem	132
4.8.2.1	Fluoreszenzmikroskopie	136
4.8.2.2	Impedanzspektroskopie	136
4.8.3	Biosensorische Detektion von HEK293-Zellen über DCC-Rezeptoren	138
4.8.3.1	HEK293-Zellen mit DCC-Rezeptor als Zellmodell	138
4.8.3.2	Detektion von HEK293-DCC-Zellen mit Sensorobjektträgern in einem Durchflusssystem	141
5	Diskussion	143
5.1	Stabilität und Regulierung des offenen Ag/AgCl-Referenzsystems	143
5.2	Festlegung der Leitsalz- und Redoxionenkonzentration	145
5.3	Signalqualität der 9WPtE-Elektrodenarraychips	148
5.3.1	Design des 9WPtE-Elektrodenarrays	148
5.3.2	Präparation dünner Metallschichten auf Borosilikat	148
5.3.3	Verzicht auf die Leiterbahnisolierung	151
5.3.4	Reproduzierbarkeit der Impedanzmessungen	152
5.3.5	Wiederverwendbarkeit der 9WPtE-Chips	154
5.4	Stabile Immobilisierung von Proteinen auf den Goldelektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips durch Chemoligation mit Thiol-SAMs	156
5.4.1	Bildung stabiler, sich selbst-organisierender Thiolschichten	156
5.4.2	Stabile Immobilisierung von Antikörpern an Thiol-SAMs	160
5.5	Biosensor zur Detektion von Tenascin C	161
5.6	Detektion von ganzen Zellen	164
5.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	167
6	Zusammenfassung	169

7 Summary	171
Literaturverzeichnis	XIV
Anhang	XXX

Abbildungsverzeichnis

1	Funktionsweise eines Biosensors	2
2	Elektrochemische Zelle mit Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode in Elektrolytlösung	9
3	Zyklovoltammetrie oder Dreiecksspannung	11
4	Transformation der realen Größen des Wechselstromkreises in komplexe Größen	13
5	Darstellungsformen für Impedanzspektren	15
6	Randles Ersatzschaltbild	17
7	Struktur von Tenascin C (TnC)	21
8	Rotationsbeschichter und Heizplatte zum Trocknen und Belacken der Substrate	40
9	Masken für die photolithographische Strukturierung	41
10	Belichter <i>MA6</i>	42
11	Sputteranlage zum Aufbringen der Metallschichten auf das Substrat	44
12	Schema der Fertigungsschritte für den 9WPtE-Elektrodenarraychip im Reinraum	47
13	Sputtermaske zum Aufbringen von streifenförmigen Elektroden auf Objektträger	50
14	Reaktionsmechanismus für die durch Peroxidase katalysierte Redoxreaktion von 3-Amino-9-ethylcarbazol zu 3-Azo-9-ethylcarbazol	57
15	Aufbau der Messeinheit aus Elektrodenarraychip (EA), Adapter, Multiplexer, Potentiostat und Computer (PC)	65
16	Querschnitt einer elektrochemischen Zelle aus Arbeits- (AE) und Gegenelektrode (GE) des Elektrodenarraychips und der integrierten Ag/AgCl-Referenzelektrode (RE) in Elektrolytlösung	66
17	CV-Diagramme für verschiedene Konzentration des Leitsalzes KCl	69
18	CV-Messungen in Abhängigkeit von der Potentialvorschubgeschwindigkeit	70
19	Einfluss der Wechselstromamplitude auf die Impedanzmessung	74
20	Nyquistplots für verschiedene Konzentrationen des Leitsalzes KCl (c_{KCl})	75

21	Impedanzparameter R_s , R_{ct} , A , n und σ als Funktion der Konzentration des Leitsalzes KCl (c_{KCl})	76
22	Aktivitätskoeffizienten (y_{\pm}) für K^+ und Cl^- in Abhängigkeit von der Konzentration des Elektrolyten (c_{KCl})	81
23	Zyklovoltammetrisch gemessene und berechnete Zellpotentiale (E'^o) von Ferri-/Ferrocyano- (je 0.5 mM) gegen die Ag/AgCl-Referenz in Lösungen mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (c_{KCl})	83
24	Zyklovoltammetrische Messungen für verschiedene Konzentrationen des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyano- (c_{FeCy})	84
25	Nyquistplots für verschiedene Konzentrationen des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyano- (c_{FeCy})	86
26	Impedanzparameter σ , R_{ct} , R_s , A und n als Funktion der Konzentration des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyano- (c_{FeCy})	87
27	Oberflächentopographien der Arbeitselektroden nach DC- und HF-Sputtern .	91
28	Stabilität der Metallschichten der Elektrodenarraychips in Abhängigkeit von der Haftvermittlerschicht	93
29	Oberflächentopographien der Haftvermittlerschichten und Arbeitselektroden .	94
30	Aufbau des 9WPtE-Elektrodenarraychips	96
31	CV-Diagramme für Elektroden mit und ohne SU8-Isolierungsschicht	98
32	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und Elektroden ohne SU8-Lack mit geraden (-SU8 (-)) und gewinkelten (-SU8 (\angle)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer	100
33	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ in Abhängigkeit von der Elektrodenarraycharge	102
34	Korrelation der Impedanzparameter der Arbeitselektroden mit ihrer Schichtdicke	104
35	Zeitliche Stabilität der Impedanzspektren	106
36	Oberflächentopographien der unbenutzten und der 20 Mal benutzten und recycelten Arbeitselektrode	108
37	Vergleich von CV-Messungen mit Elektroden direkt nach der Herstellung und nach 15-20 Recyclingprozeduren	109
38	Vergleich von Impedanzmessungen mit Elektroden direkt nach der Herstellung und nach 15-20 Recyclingprozeduren	110
39	Chemoligation von Antikörpern als biologische Erkennungselemente an Carboxyalkanthalen	112
40	Zyklovoltammogramme der sauberen Elektroden und der Elektroden nach Inkubation mit verschiedenen Thiolen	114

41	Impedanzparameter R_{ct} von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs	116
42	Stabilität des Antikörper-Peroxidase-Konjugats auf den mit MUDA beschich- teten Elektroden	120
43	Indirekte biosensorische Detektion von Tenascin C (TnC)	122
44	<i>Sandwich</i> -Verfahren zur biosensorischen Detektion von Tenascin C	124
45	Kompetitives Verfahren zur biosensorischen Detektion von Tenascin C	125
46	Impedanzmessungen zur konzentrationsabhängigen kompetitiven Detektion von Tenascin C	127
47	Konzentrationsabhängige Detektion von Tenascin C mittels <i>Dot Blot</i>	128
48	Prinzip der biosensorischen Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE- Elektrodenarraychip	130
49	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Anzahl gebundener Polystyrolpar- tikel auf dem 9WPtE-Biosensor	131
50	Impedanzmessungen zur Detektion von Polystyrolpartikeln auf dem 9WPtE- Biosensor	132
51	Sputtermaske und Sensorobjektträger	133
52	Aufbau der Messeinheit aus Sensorobjektträger, Referenzelektrode (RE), Po- tentiostat und Computer (PC)	134
53	Prinzip der biosensorischen Detektion von Polystyrolpartikeln auf dem Sensor- objektträger und Aufbau des Durchflusssystems zum Waschen der Sensorober- fläche	135
54	Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Polystyrolpartikeln auf den Sensor- objektträgern	136
55	Impedanzmessungen zur Detektion von Polystyrolpartikeln auf den Sensorob- jektträgern	137
56	Schema der biosensorischen Detektion von ganzen Zellen	138
57	Nachweis der Expression und Lokalisation des DCC-eCFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen transfiziert mit einem Vektor mit DCC-eCFP-Gensequenz . .	140
58	Mikroskopische und impedimetrische Detektion von HEK293 _{DCC-eCFP} -Zellen auf den Sensorobjektträgern	142
59	Vektorkarte des pVITRO2-hygro-mcs von InvivoGen mit der Sequenz für das DCC-eCFP-Fusionsprotein	XXX

Tabellenverzeichnis

1	Definition, Phasenverschiebung und Frequenzabhängigkeit üblicher Schaltelemente elektrochemischer Impedanzmessungen	16
2	Kriterien zur Bestimmung von einfachen Reaktionsmechanismen	54
3	CV-Parameter $I_{p,a}$, $I_{p,k}$, E'^o und ΔE_p als Funktion der Konzentration des Leitsalzes (c_{KCl})	69
4	Impedanzparameter R_s , R_{ct} , A , n und σ als Funktion der KCl-Konzentration (c_{KCl})	77
5	Potentiale einer Ag/AgCl-Referenzelektrode ($e_{Ag/AgCl}$) für verschiedene KCl-Konzentrationen (c_{KCl})	82
6	CV-Parameter $I_{p,a}$, $I_{p,k}$, E'^o (<i>vs.</i> Ag/AgCl) und ΔE_p als Funktion der Ferri-/Ferrocyankonzentration (c_{FeCy})	85
7	Impedanzparameter R_{ct} , σ , R_s , A und n als Funktion der Ferri-/Ferrocyankonzentration (c_{FeCy})	88
8	CV-Parameter $I_{p,a}$, $I_{p,k}$, E'^o (<i>vs.</i> Ag/AgCl) und ΔE_p für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und Elektroden ohne SU8-Lack mit geraden (- SU8 (-)) und gewinkelten (- SU8 (\angle)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer	97
9	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und ohne SU8-Lack mit geraden (- SU8 (-)) und gewinkelten (- SU8 (\angle)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer	101
10	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ als Funktion der Chargennummer . .	103
11	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ als Funktion der Elektrodenarraychipnummer	105
12	Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ als Funktion des Messzeitpunktes . .	106
13	Struktur und Eigenschaften der eingesetzten Thiole	113
14	Impedanzparameter R_{ct} von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs	115
15	Impedanzparameter A von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs	117

Gleichungsverzeichnis

1	Reaktionsgleichung Redoxreaktion	10
2	Nernstsche Gleichung	10
3	Randles-Sevčík-Gleichung	11
4	Separation der Stromstärkepeaks für reversible Reaktionen	12
5	Allgemeiner Zusammenhang zwischen den Spitzenspannungen und dem formalen Standardpotential	12
6	Zusammenhang zwischen den Spitzenspannungen und dem formalen Standardpotential für gleiche Diffusionskoeffizienten	12
7	Ohmsches Gesetz im Wechselstromkreis	13
8	Eulersche Formel	14
9	Impedanz in Polarkoordinaten und kartesischen Koordinaten	14
10	Impedanz des ohmschen Widerstands	55
11	Impedanz des CPE	55
12	Warburgimpedanz	55
13	Mathematische Beschreibung des Ersatzschaltbildes $((R_{ct} - Z_W) CPE) - R_s$. . .	55
14	Mathematische Beschreibung des Ersatzschaltbildes $(R_{ct} CPE) - R_s$	55
15	Debye-Hückel-Länge	76
16	Kapazität (Plattenkondensator)	77
17	Zellpotential der Ag/AgCl-Referenzelektrode	78
18	messbares Zellpotential	78
19	Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration	78
20	Berechnung der Ionenstärke	79
21	Debye-Hückel-Grenzgesetz für Ionenstärken $I \leq 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	79
22	Berechnung des Parameters A im Debye-Hückel-Grenzgesetz	79
23	Debye-Hückel-Grenzgesetz für Ionenstärken $I \leq 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	79
24	Berechnung des Parameters B im Debye-Hückel-Grenzgesetz	79
25	Davies-Gleichung	80
26	Umrechnung von Konzentrationen in Molalitäten	80
27	Halbzellpotential für Ferri-/Ferrocyanid	82
28	Halbzellpotential für Ferri-/Ferrocyanid mit Davies-Gleichung	82

29	Warburgkoeffizient	86
30	Widerstand eines Leiters	99
31	Allgemeine relative Änderung des R_{ct}	107
32	Relative Änderung der CV-Parameter durch Recycling	109
33	Relative Änderung des R_{ct} nach Präzipitatbildung verglichen mit der Sensorelektrode	119
34	Relative Änderung des R_{ct} nach Präzipitatbildung bezogen auf die mit MUDA beschichtete Elektrode	122

Abkürzungsverzeichnis

9WPtE	9- <i>well</i> -Platin-Elektrode (Chipbezeichnung)
AE	Arbeitsselektrode
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
AK	Antikörper
ANSI	<i>American National Standards Institute</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CPE	konstantes Phasenelement
CV	Zyklovoltammetrie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Gleichstrom
DCC	<i>Deleted in Colorectal Cancer</i>
EA	Elektrodenarray
eCFP	<i>enhanced Cyan Fluorescent Protein</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
<i>et al.</i>	lat., und andere
GE	Gegenelektrode
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HF	Hochfrequenz
ITO	Indiumzinnoxid
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MCX	<i>micro coaxial</i> , mikro-koaxial
MGS	Molekulargewichtsstandard
MHO	6-Mercaptohexanol
MPA	3-Mercaptopropionsäure
MUDA	11-Mercaptoundekansäure
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	<i>Personal Computer</i> , Computer
PMMA	Polymethylmethacrylat
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R_{ct}	Ladungstransferwiderstand
RE	Referenzelektrode
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
R_s	Lösungsmittelwiderstand
SAM	<i>self-assembled monolayer</i> , sich selbst-organisierende Monoschicht
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
TnC	Tenascin C
URL	<i>Uniform Resource Locator</i> , einheitlicher Quellenanzeiger
v/v	Volumenprozent
w/v	Masseprozent

1 Einleitung

„Groß ist die Aufgabe, die vor mir steht und bescheiden sind die Kenntnisse und Kräfte, die für ihre Bewältigung ausreichen sollen. Aber Aufgaben sind da, um gelöst zu werden, und welcher Schlachtruf wäre wohl besser geeignet, den Ermatteten mit neuem Mut zu erfüllen, als das Wort: Energie?“

(Wilhelm Ostwald 1853-1932)

1.1 Biosensoren

Eine patientenindividuelle medizinische Diagnostik, Umwelt- und Lebensmittelkontrollen, Kosmetik- und Medikamententests, der Nachweis von Toxinen, Drogen oder Sprengstoffen, die Erforschung der genetischen und molekularen Ursachen von Krankheiten - all dies sind Anwendungsfelder für Biosensoren. Ihre Vorteile gegenüber der althergebrachten Diagnostik bestehen in der einfachen Zeit- und Ressourcen-sparenden Anwendbarkeit und in ihrer Automatisier-, Miniaturisier- und Parallelisierbarkeit. Biosensoren können als *all-in-one* Geräte tragbar konstruiert werden. Die Detektion der Analyten ist markierungs- und zerstörungsfrei, *online* und in Echtzeit möglich und durch die Biokomponente extrem spezifisch. Das Interesse und der Bedarf an innovativen Biosensoren spiegelt sich in der steigenden Anzahl von relevanten Veröffentlichungen pro Jahr wider. 2000 waren dies 788, 2005 bereits 1827 und im Jahr 2011 wurden 2855 Publikationen mit dem Begriff „biosensor“ veröffentlicht (Suche bei PubMed).

Ein Biosensor ist nach IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ein in sich geschlossenes integriertes Instrument, was spezifische quantitative oder semi-quantitative analytische Informationen übergeben kann. Es besteht aus einem biologischen Erkennungselement in räumlicher Nähe zu einem Signalwandler (Transducer). Der Analyt interagiert mit dem biologischen Erkennungselement und diese Interaktion wird vom Signalwandler in ein messbares Signal umgewandelt. Von konventionellen analytischen Systemen wie z. B. HPLC (*high performance liquid chromatography*) unterscheidet sich der Biosensor darin, dass keine zusätzlichen Separierungsschritte nötig sind.^[1]

Die Elemente der biosensorischen Detektion, die spezifische biologische Erkennungskomponente und der Signalwandler, können vielgestaltig sein und dienen der Klassifizierung der

Biosensoren. In Abb. 1 ist der prinzipielle Aufbau eines Biosensors mit den genannten Komponenten und Beispielen gezeigt.

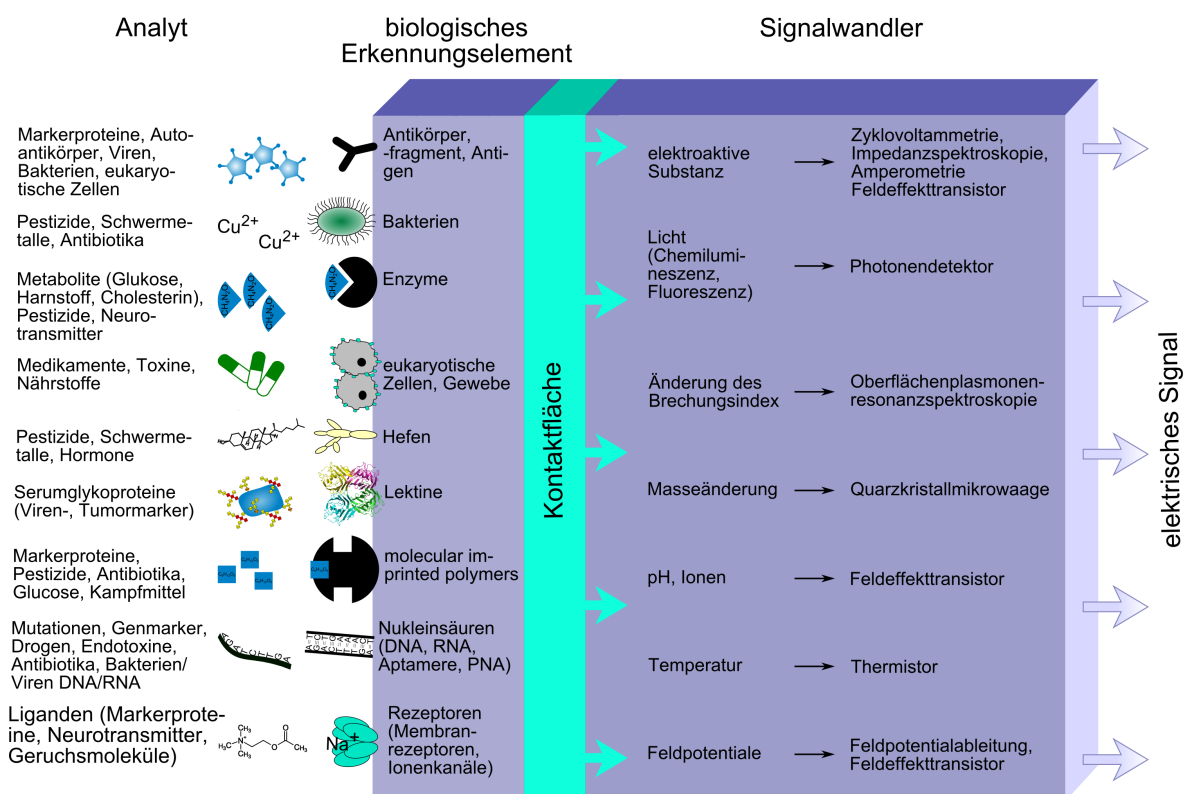


Abbildung 1: Funktionsweise eines Biosensors. Der Analyt wird vom biologischen Erkennungselement gebunden oder umgesetzt. Dadurch entsteht ein Signal, welches mittels Signalwandler in ein elektrisches Signal umgewandelt wird. Das biologische Erkennungselement ist dafür an den Signalwandler gekoppelt. Die abgebildete 3D-Struktur des Lektins stammt aus der *Protein Data Bank Europe* (www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/images/entry/3qlq-cbc600.png, geprüft am 04.09.2012).

1.1.1 Biologische Erkennungselemente

Die in Biosensoren genutzten biologischen Erkennungselemente reichen von kleinen Molekülen, wie einem Oligonukleotid, zu ganzen Zellverbänden, wie z. B. Hirnschnitten. Genauso vielfältig wie die Struktur der Erkennungselemente ist ihre Interaktion mit dem Analyten. Sie lassen sich aber grob in zwei Gruppen unterteilen: Die Biokomplex-bildenden Elemente interagieren mit dem Analyten durch Bindung, wie z. B. ein Antikörper sein Antigen bindet. Die biokatalysatorischen Elemente befördern unter Analyteinfluss eine bestimmte Reaktion wie z. B. Redoxreaktionen durch Enzyme oder bewirken komplexe physiologische und morphologische

Reaktionen wie bei Zellen oder Geweben.^[1] Die folgenden Abschnitte werden einen Überblick über die Bandbreite der in Biosensoren verwendeten biologischen Erkennungselemente geben.

1.1.1.1 Biokomplex-bildende Erkennungselemente

Antikörper und Antikörperfragmente Antikörper werden in Biosensoren wegen ihrer, in klassischen proteinanalytischen Assays wie ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) gezeigten, hohen Affinität und Spezifität für ihre entsprechenden Antigene eingesetzt. Diese Biosensoren werden dann auch Immunosensoren genannt.

Es ist theoretisch möglich, Antikörper für jedes gewünschte Antigen herzustellen. Da Antikörper in mehreren Domänen organisiert sind, lassen sich diese Domänen molekularbiologisch variabel kombinieren. So können z. B. die schweren und leichten variablen Ketten der Antikörper über Peptidlinker verknüpft werden. Die dadurch geformten scFv-Moleküle (*single chain variable fragment*) sind bedeutend kleiner, flexibler und proteaseresistenter als normale Antikörper, beinhalten aber die antigenerkennenden Regionen (CDR - Komplementarität bestimmende Region). Sie können durch Disulfidbrücken stabilisiert und miteinander kombiniert werden.^[2,3]

Durch Verwendung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten als biologische Erkennungselemente in Biosensoren konnten z. B. pathologierelevante Biomarker detektiert werden. Yin und Liu *et al.* haben einen Antikörper-basierten Biosensor für den Tumornekrosefaktor α (TNF α) entwickelt^[4]. Die biosensorische Detektion von erhöhten TNF α -Konzentrationen im Serum über einen anti-TNF α -Antikörper kann dem Nachweis verschiedenster pathologischer Prozesse wie HIV-Infektion, neonataler Listerose, rheumatoider Arthritis oder endotoxischer Schocks dienen^[5].

Nicht nur Proteine können mittels antikörperbasierten Biosensoren detektiert werden. Auch ganze Viruspartikel können nachgewiesen werden. So entwickelten Cooper und Dultsev *et al.* einen Biosensor für *Herpes simplex Virus Typ 1*^[6] und Wang und Wang *et al.* einen für den *Influenza Virus H5N1*^[7]. Auch Bakterien konnten bereits über spezifische Oberflächenmarker gebunden werden, so z. B. *Escherichia coli*^[8,9], *Salmonella typhimurium*^[10,11] und *Bacillus globigii*^[12]. Ebenso existieren Biosensoren basierend auf Antikörpern für die größeren und komplexeren eukaryotischen Zellen, wie z. B. Tumorzellen. Ehrhart und Bennetau *et al.* konnten Zellen der Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D über Antikörper gegen das Oberflächenantigen EpCAM (epitheliales Zelladhäsionsmolekül) detektieren^[13]. Und Nagrath und Sequist *et al.* isolierten mit ihrem Biosensor sogar die seltenen zirkulierenden Tumorzellen, die im Blut von Patienten mit Metastasen auftreten^[14].

Statt dem Antikörper als biologisches Erkennungsmolekül und dem Antigen als Analyten wurden auch Biosensoren entwickelt, in denen die Situation umgekehrt war. Balkenhohl und Lisdat *et al.* haben einen Immunosensor zur Detektion von Autoantikörpern gegen Glia-

din entwickelt, die bei Patienten mit Zöliakie gebildet werden, wenn diese Gluten mit der Nahrung aufnehmen^[15]. Genauso können statt den großen Antikörpern kurze Peptide als Erkennungsmoleküle benutzt werden. Kerman und Kraatz nutzten Peptide mit weniger als 20 Aminosäuren zur Detektion von Enzymen des HI-Virus.

Nukleinsäuren Biosensoren, die Einzelstränge von Nukleinsäuren als biologische Erkennungsmoleküle nutzen, beruhen auf der Fähigkeit dieser Moleküle andere Einzelstrang-Nukleinsäuren zu binden. Vom Grad der Komplementarität der Nukleinsäure-Sonden und der Analytmoleküle hängt die Stärke der Hybridisierung ab, die in ein auslesbares Signal umgewandelt werden kann.

DNA findet vielfältige Anwendung als Erkennungsmolekül zur Identifizierung von Mutationen mit Bezug zu pathologischen Entwicklungen^[16,17]. So kann die Variation in einzelnen Basen biosensorisch nachgewiesen werden^[18]. Auf der Änderung eines einzelnen Basenpaars, den sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP), beruhen Unterschiede zwischen Patienten bezüglich der Entwicklung von Krankheiten oder der Reaktion auf Therapien. Die Entdeckung genetisch bedingter Krankheitsentwicklungen oder die Entscheidung über Therapieabläufe können durch DNA-Biosensoren unterstützt werden. Mit Einzelstrang-DNA als Sonde kann aber auch RNA detektiert werden. So haben Bäumner und Schlesinger *et al.* einen DNA-Sensor aufgebaut, der spezifisch RNA des *Dengue-Virus* erkennt^[19].

Eine besondere Form der DNA, die *molecular beacons* („molekulare Blinklichter“), wurden z. B. von Culha und Stokes *et al.* benutzt, um einen Sensor für das Brustkrebsmarkergen *BRCA1* aufzubauen^[20]. *Molecular beacons* sind einzelsträngige DNA-Moleküle (20-40 Nukleotide), die in einer Haarnadelstruktur vorliegen, d. h. sie besitzen einen Stamm mit Basenpaarungen und eine Schleife, in der die Basen ungepaart vorliegen. In der Schleife befinden sich die zum Analyten komplementären Sequenzen und an den Stamm werden meist Reportermoleküle wie z. B. Fluoreszenzmarker bzw. -quencher gekoppelt.^[21]

Eine Bindung des Analyten mit DNA als Erkennungsmolekül kann nicht nur durch Sequenzkomplementarität erfolgen. Auch die 3-D Struktur von DNA kann bei der Bindung eine Rolle spielen. Ähnlich wie der Antikörper durch seine räumliche Struktur das Antigen erkennt, kann auch DNA durch ihre 3-D Struktur den Bindungspartner erkennen. Dabei spielen elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken und Basen-Stapelungen eine Rolle. Moleküle, die den Analyten durch ihre 3-D Struktur binden, werden Aptamere genannt (aus dem lateinischen *aptus* für passen)^[22]. Aptamere sind Moleküle mit 20-100 Nukleotiden, die eine ebenso hohe Bindungsaffinität wie Antikörper erreichen können^[22]. DNA-Aptamer-Biosensoren wurden beispielsweise zum Nachweis von Kokain^[23] und Endotoxinen wie Lipopolysacchariden^[24] eingesetzt. Auch RNA-Aptamer-Biosensoren wurden entwickelt, so z. B. zur Bestimmung der

Serumkonzentration des Antibiotikums Tobramycin^[25].

Eine vielversprechende Alternative zu DNA in Biosensoren bietet ein Analogon der Desoxyribonukleinsäure, die PNA (Peptidnukleinsäure). Statt dem Phosphat-Zucker-Rückgrat besitzt die PNA ein Pseudopeptid-Rückgrat (meist aus Aminoethylglycin-Einheiten). Sie hybridisiert ebenfalls basenpaarspezifisch mit DNA, zeigt jedoch höhere chemische und enzymatische Stabilität als DNA^[26]. PNA-DNA Duplexe haben eine höhere chemische und thermische Stabilität als DNA-DNA Komplexe, was durch das Fehlen der Ladung im Polyamidrückgrat der PNA verursacht wird^[27,28]. Beispiele für PNA als biologische Erkennungskomponente in Biosensoren sind die Identifizierung und Genotypisierung des *Hepatitis C Virus*^[29] und die Detektion von genetischen Mutationen im *p53* Gen^[30] und im CFTR Gen (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)^[31]. Letztere Mutation ist die Ursache für Zystische Fibrose (Mukoviszidose).

Rezeptoren Rezeptoren können ähnlich wie Antikörper als biologische Erkennungskomponenten in Biosensoren eingesetzt werden. Sezginürk beispielsweise nutzte den VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Rezeptor 1 zur Detektion des Liganden VEGF, der als Brustkrebsmarker gilt^[32]. Einen Geruchssensor mit ODR-10-Rezeptoren, sensitiv für Geruchsmoleküle wie Diacetyl oder Butanon, entwickelten Wu und Du *et al.*^[33]. Und Hoffmann und Canziani *et al.* untersuchten die Membranrezeptor-Ligand-Beziehungen an Chemokinrezeptoren, die als Korezeptoren für das HIV-Hüllprotein fungieren^[34]. Ein Beispiel für den Einsatz von ionotropen Rezeptoren, also Ionenkanälen, in Biosensoren ist die Detektion von Anthrax über das PA₆₃-Fragment (protektives Antigen A), was ein Bestandteil des Anthrax-Toxins ist und Kanäle in einer Lipidmembran bildet^[35].

Lektine Lektine sind Glykoproteine, die spezifisch an Zellen oder Zellmembranen binden und Vorgänge wie die Zellteilung oder die Agglutination von Zellen beeinflussen können. Die agglutinierenden Eigenschaften von Concanavalin A, einem Lektin der Riesenbohne (*Canavalia ensiformis*), nutzten Oliveira und Correia *et al.* zum Nachweis von Serumglykoproteinen bei Patienten, die mit dem *Dengue Virus* infiziert waren^[36]. La Belle und Gerlach *et al.* konnten mit ihrem Lektin-Biosensor die Möglichkeit zur spezifischen Detektion von Glykanen anhand ihres Glykosilierungsmusters demonstrieren^[37].

Molecular imprinted polymers Eine Sonderform der Biokomplex-bildenden Erkennungselemente sind die *molecular imprinted polymers* (molekular-geprägte Polymere). Obwohl es streng genommen keine biologischen Erkennungsmoleküle sind, sollen sie hier wegen ihrer Fähigkeit die Biologie zu imitieren Erwähnung finden. Diese künstlichen Polymere werden unter Anwesenheit des gewünschten Analyten geformt, dann wird der Analyt ausgewaschen und es verbleibt eine Bindungsstelle im Polymernetzwerk, die exakt an das Analytmolekül angepasst

ist. Darüber hinaus ist das molekular-geprägte Polymer im Vergleich zu natürlichen Biokomplexbildnern wie Antikörpern physikalisch und chemisch stabiler und leichter zu präparieren. Von Li und Jiang *et al.* wurde z. B. ein Polymer aus *o*-Phenylendiamin verwendet, um das Antibiotikum Oxytetracyclin aus einer Probe zu detektieren^[38]. Yang und Yi *et al.* hingegen nutzten ein durch Licht vernetzbares Polymer zur Entwicklung eines Glucosesensors^[39].

1.1.1.2 Biokatalytische Erkennungselemente

Enzyme Enzyme werden als biologische Erkennungskomponenten in Biosensoren verwendet, weil sie die Fähigkeit besitzen bestimmte Reaktionen zu katalysieren, die dann ein auslesbares Signal hervorrufen. Das kann das Auftreten eines Stromflusses sein, die Bildung eines farbigen Produktes, eines Niederschlags oder Lichtsignals. Es existieren vielfältige Beispiele für die Anwendung von Enzymen als biologische Erkennungselemente in Biosensoren.

Glucoseoxidase wurde beispielsweise als biologisches Erkennungselement eingesetzt, um Glucose zu detektieren^[40–42]. Die genaue Bestimmung der Glucosekonzentration ist für Diabetiker tagtäglich lebenswichtig und daher ein bedeutendes Anwendungsgebiet für Biosensoren. Andere Beispiele für Sensoren mit Enzymen als Biokatalysatoren sind Harnstoffbiosensoren mit Urease als Enzym^[43], Biosensoren zum Nachweis von Organophosphorpestiziden durch Acetylcholinesterase^[44], γ -Aminobuttersäure-Sensoren mit Gabase (Komplex aus GABA-Transaminase und Succinatsemialdehyd-Dehydrogenase)^[45] oder Biosensoren, bei denen Wasserstoffperoxid durch Meerrettichperoxidase detektiert wird^[46].

Zellen und Zellgewebe Auch ganze Zellen oder Zellgewebe können als biokatalytische Erkennungselemente dienen. Dabei können die katalytischen Prozesse, die auf die Exposition mit einem Analyten erfolgen, komplex sein, wie z. B. die Expression bestimmter Gene.

Bakterienzellen werden beispielsweise benutzt, um Organophosphorpestizide oder Kampfmittel zu detektieren^[47,48]. Urban und Eckermann *et al.* entwickelten einen *Bacillus subtilis*-Sensor, mit dem es möglich ist neue Antibiotika im Hochdurchsatz zu testen^[49]. Auch Hefen werden als Erkennungselemente eingesetzt. Lehmann und Riedel *et al.* bauten einen Biosensor für das Schwermetallion Cu^{2+} basierend auf gentechnisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae* Zellen auf^[50] und Bovee und Lommerse *et al.* nutzten einen gentechnisch veränderten *S. cerevisiae* Stamm als biologischen Messfühler zur Detektion von Steroidhormonen. Tierische oder menschliche eukaryotische Zellen werden in Biosensoren benutzt, um z. B. die Wirkung von potentiellen Medikamenten^[51] oder Toxinen^[52] zu testen. Außerdem wird die Stimulation von eukaryotischen Zellen über bestimmte Rezeptoren-Ligand Interaktionen^[53–55] oder die Kontrolle von Ionenkanälen^[56–58] biosensorisch untersucht. Mit zellbasierten Biosensoren können physiologische und pathologische Prozesse überwacht werden^[59,60]. Dabei werden sowohl adhärente einschichtige Kulturen^[53,56,59,60] als auch dreidimensionale Kulturen^[51,52]

eingesetzt. Jahnke und Bräsigk *et al.* (2012) konnten zeigen, dass es sogar möglich ist ganze Gewebe, in diesem Fall Schnittkulturen des Hippocampus, als biologische Erkennungskomponenten in Biosensoren zu verwenden^[61]. Die Wissenschaftler wiesen mit ihrem Biosensor die durch induzierte Tau-Hyperphosphorylierung auftretende Degeneration von Neuriten nach.

1.1.2 Signalwandler

Die Art der primären Signale und deren anschließender Umwandlung sind bei Biosensoren divers und hängen vom biologischen Erkennungselement ab. Bei den Biokomplex-bildenden Antikörpern, Nukleinsäuren und Rezeptoren kann die Bindung des Analyten z. B. ein optisches Signal (Fluoreszenz, Chemilumineszenz) hervorrufen, dass per Photonendetektor in ein elektronisches Signal umgewandelt werden kann^[62–64]. Genauso kann die biokatalytische Reaktion eines Enzyms mit den Analyten in einem Lichtsignal resultieren^[65].

Eine andere optische Signalwandlungstechnik ist die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie). Sie diene z. B. Ferriotto und Corradino *et al.* zur Entwicklung eines Biosensors für die Detektion einer speziellen Punktmutation, welche zur Entwicklung der Zystischen Fibrose führt^[31]. Bei der SPR-Spektroskopie wird Licht auf eine mit einem Edelmetall wie Gold beschichteten Glasoberfläche geleitet. Dabei wird Energie der Photonen auf Oberflächenelektronen des Metalls übertragen und es entstehen sogenannte Oberflächenplasmonen. Der Vorgang wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet und hängt von der Wellenlänge und dem Winkel des einfallenden Lichts ab. Werden durch Biokomplexbildung Analyten an die Elektrode gebunden, so interagieren die Oberflächenplasmonen mit ihnen, wodurch sich der Winkel des einfallenden Lichts, bei dem Oberflächenplasmonenresonanz auftritt, ändert. Diese Änderung ist ein quantitatives Signal für die Anzahl der gebundenen Moleküle.^[66]

Die Bildung eines Komplexes aus biologischer Erkennungskomponente und Analyt geht auch mit einer Massenzunahme einher. Mit Hilfe einer Quarzkristallmikrowaage kann diese Massenänderung in ein elektrisches Signal umgewandelt werden, wobei das Erkennungselement auf dem Schwingquarz immobilisiert wird. Quarz ist piezoelektrisch, d. h. wenn Wechselspannung an den Quarz angelegt wird, so verformt er sich oszillierend. Die Frequenz dieser Oszillation sinkt mit zunehmender Dicke des Kristalls bzw. mit der zusätzlichen Masse, die auf den Kristall aufgebracht wird. Aus der Frequenzänderung kann demnach auf die Bindung des Analyten geschlossen werden. Balkenhohl und Beutler *et al.* entwickelten Biosensoren basierend auf Quarzkristallmikrowaagen zur Detektion von Autoantikörpern^[67], Cooper und Dultsev *et al.* zum Nachweis von *Herpes simplex* Viren^[6] und Mwilu und Aluoch *et al.* zur Identifizierung von *Bacillus globigii* Bakterienzellen^[12].

Biokomplexbildung oder biokatalytische Prozesse können auch in ein elektrochemisches Signal umgewandelt werden. Dabei können z. B. Änderungen in den dielektrischen Eigenschaften

ten von Zellen und Geweben durch den Analyten mittels Impedanzspektroskopie untersucht werden. Andererseits können auch Bindungsereignisse elektrochemisch verfolgt werden. Dazu ist das Erkennungselement an eine Elektrode gekoppelt. Wird eine redoxaktive Substanz zugegeben, so hängt deren Umsatz an der Elektrode von der Menge an gebundenem Analyten ab. Je mehr Analyt gebunden ist, desto mehr wird die Redoxreaktion behindert. Mittels Zyklovoltammetrie (CV) oder elektrochemischer Impedanzspektroskopie (EIS) kann die Redoxreaktion in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Biosensoren die CV und EIS als Signalwandlungstechniken nutzen, reichen von Sensoren für die Detektion von Metaboliten wie Glucose^[42] und klinischen Markerproteinen^[68–70], über Sensoren für den spezifischen Nachweis von Nukleinsäuren^[17,18] und Pathogenen^[8,9], bis zu Biosensoren für die Untersuchung pathologischer Prozesse^[59–61] oder für Wirkstofftests^[51] an ganzen Zellen oder Geweben. Die Grundlagen beider Techniken werden in den Abschnitten 1.2 und 1.3 detailliert beschrieben. Bei einer weiteren elektrochemischen Technik, der Amperometrie, dient die Oxidation oder Reduktion des Analyten als Messsignal. An einer Elektrode wird ein fixes Potential angelegt und die entsprechende Stromstärke gemessen. Finden an der Elektrode Redoxreaktionen statt, so steigt die Stromstärke an. Beispiele für amperometrische Sensoren sind Sensoren basierend auf Enzymen, welche die Oxidation oder Reduktion des Analyten katalysieren^[40,71]. Aber auch die Oxidation oder Reduktion eines Produktes der enzymatischen Umwandlung des Analyten kann seine Detektion ermöglichen^[41]. Amperometrische Sensoren wurden auch mit Organismen wie Hefezellen^[50,72] und Bakterien^[47,48] als Erkennungskomponenten beschrieben.

Neben Elektroden, werden auch Feldeffekttransistoren (FET) in Biosensoren verwendet. Sie können Änderungen im pH-Wert oder Redoxreaktionen in elektrische Signale umwandeln. Aufbauend auf ionensensitiven Feldeffekttransistoren entwickelten Kisner und Stockmann *et al.* einen Biosensor für den Neurotransmitter Dopamin^[73]. Subramanian und Aschenbach *et al.* konnten mit ihrem Sensor aus Kohlenstoffnanoröhren-FET mit immobilisierten DNA-Sonden kleine Mengen von *E. coli* O157-DNA ohne vorherige Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion detektieren^[74]. Eine Enzym-katalysierte Redoxreaktion konnte von Ishige und Shimoda *et al.* mittels FET nachgewiesen werden^[75]. Sie nutzten einen FET-basierten Biosensor mit Cholesterindehydrogenase, um die Konzentration von Cholesterin zu bestimmen.

Neben den genannten Signalwandlungstechniken gibt es noch eine Reihe anderer Techniken. Von diesen sollen lediglich noch die Temperaturmessung durch Thermistoren^[76], die eine mit der Analytdetektion einhergehende Wärmeentwicklung registrieren und die Feldpotentiale ableiten, mit der elektrogene Zellen und die Funktion von Ionenkanälen untersucht werden können^[54,57], genannt werden.

1.2 Zykvoltammetrie

Die Zykvoltammetrie (*cyclic voltammetry*, CV) ist eine vielseitige elektroanalytische Methode, mit der elektrochemische Ladungstransferreaktionen an Elektroden untersucht werden. Aufgrund ihrer simplen Durchführbarkeit wird sie für verschiedenste Zwecke eingesetzt, etwa zur Untersuchung anorganischer und organischer Substanzen und biologischer Materialien oder zur Charakterisierung der Oberfläche einer Elektrode.

Die Messanordnung besteht für die Zykvoltammetrie aus einer unbewegten Elektrolytlösung, in der sich redoxaktive Substanzen befinden. In Kontakt mit der Elektrolytlösung stehen eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode (Abb. 2). Zur Untersuchung von Redoxreaktionen an der Arbeitselektrode wird oft eine zusätzliche dritte Elektrode eingeführt, die das Potential der Arbeitselektrode kontrolliert. Diese Referenzelektrode ist in den meisten Fällen eine Elektrode zweiter Art, die durch ihren speziellen Aufbau ein konstantes, definiertes Potential aufweist. Statt Elektroden zweiter Art können aber auch simple Metallelektroden (z. B. Platin) verwendet werden. An diesen Quasi-Referenzelektroden stellt sich zwar ebenfalls ein konstantes Potential ein, aber dieses hängt von der Zusammensetzung des Elektrolyten ab. In der Dreielektrodenkonfiguration wird mit Hilfe eines Potentiostaten die Spannung an der Arbeitselektrode bezogen auf die Referenz eingestellt, während die Gegenelektrode den auftretenden Strom aufnimmt. Die Referenzelektrode wird dabei in unmittelbarer Nähe der Arbeitselektrode positioniert, um den IR-Abfall (ohmscher Spannungsabfall) zwischen beiden Elektroden, der durch den Widerstand des Elektrolyten verursacht wird, zu verringern.^[77,78]

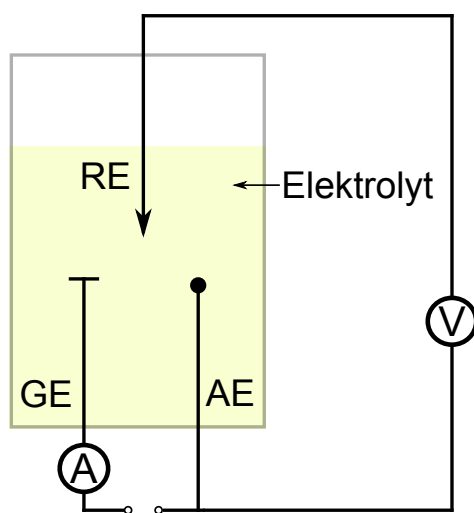


Abbildung 2: Elektrochemische Zelle mit Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode in Elektrolytlösung. In der Dreielektrodenkonfiguration fließt zwischen Arbeitselektrode (AE) und Gegenelektrode (GE) ein Strom und zwischen Arbeits- und Referenzelektrode (RE) wird die Zellspannung gemessen und geregelt.

Das Potential an der Arbeitselektrode wird linear zwischen zwei Extrema (Vertices) mit einer bestimmten Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scanrate) und einer bestimmten Stufenhöhe verändert und der resultierende Stromfluss gemessen. Nähert sich das angelegte Potential dem formalen Standardpotential der Redoxsubstanzen im Elektrolyten an, so reagieren diese an der Arbeitselektrode. Je nach dem in welche Richtung der Potentialanstieg verläuft, finden Oxidation oder Reduktion statt. Dabei werden Elektronen an die Elektrode abgegeben bzw. von der Elektrode aufgenommen, was einem faradayschen Strom entspricht. Neben dem faradayschen Strom tritt ein kapazitiver Strom auf. Dieser entsteht dadurch, dass sich die elektrische Doppelschicht an der Elektrode durch Spannungsänderungen auflädt.^[77]

Die wegen ihrer Form der Spannungsänderung auch als Dreieckspannungsmethode (Abb. 3A) benannte Zyklovoltammetrie ist eine instationäre Technik, da die gemessene Stromstärke von der Scanrate abhängt. Werden mehrere Zyklen des beschriebenen Potentialscans durchgeführt, so wird ein konstantes Zyklovoltammogramm erreicht (Abb. 3B). Seine Form gibt Aufschlüsse über den Mechanismus der Redoxreaktion und indirekt auch über die Oberflächenbeschaffenheit der Arbeitselektrode. Bestimmt wird die Form des CV-Diagramms durch die Geschwindigkeit des heterogenen Ladungstransfers zwischen der Redoxkomponente und der Elektrode. Wird das Potential an der Arbeitselektrode in die positive Richtung geändert, so wird die reduzierte Spezies (R) an der Arbeitselektrode oxidiert und die Elektrode nimmt Elektronen auf. Wird das Potential an der Arbeitselektrode hingegen in die negative Richtung geändert, so wird die oxidierte Spezies (O) an der Arbeitselektrode reduziert und die Elektrode gibt dafür Elektronen ab. Für den Fall einer einstufigen reversiblen Redoxreaktion mit



verhält sich die Oberflächenaktivität α bzw. die Oberflächenkonzentration c einer gelösten Redoxsubstanz entsprechend der Nernstschen Gleichung

$$E = E^\circ + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\alpha_{\text{O}}}{\alpha_{\text{R}}} = E'^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{\text{O}}}{c_{\text{R}}} \quad (2)$$

Hierbei ist E° das allgemeine Standardpotential der eingesetzten Redoxkomponente, E'° das formale Standardpotential in Abhängigkeit von der Ionenstärke, R ist die universelle Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, z die Anzahl der Elektronen, die bei der Redoxreaktion übertragen werden, F die Faradaykonstante, α_{O} und α_{R} die Oberflächenaktivitäten der oxidierten bzw. reduzierten Redoxspezies und c_{O} und c_{R} die jeweiligen Oberflächenkonzentrationen.

Da nun aber der Elektrolyt nicht bewegt wird, ist die Redoxreaktion diffusionskontrolliert. Je nach Richtung des Potentialanstiegs steigt die Stromstärke proportional zur Konzentration bzw. Aktivität der jeweiligen Redoxspezies. Eine zunehmende Oxidation bzw. Reduktion führt aber zu einer Verarmung der jeweiligen redoxaktiven Spezies in der Nähe der Elektrode, der Konzentrationsgradient sinkt, der Ionenstrom zur Elektrode nimmt ab, wodurch weniger Redoxionen umgesetzt werden und die Stromstärke sinkt. Zu- und Abnahme der Stromstärke resultieren in einem Peak für Oxidation und Reduktion, wobei für die Reduktion die Stromstärke nur deshalb negativ angegeben ist, um die Richtung des Stromflusses zu kennzeichnen. Die Höhe der Strompeaks ist für eine reversible Reaktion gleich und ergibt sich für eine planare Diffusion aus der Randles-Sevcik-Gleichung

$$I_p = -0,446zF \left(\frac{zF}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} A_E c_0 D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

mit I_p als gemessener Peakstromstärke, z als Anzahl der Elektronen, die bei der Redoxreaktion übertragen werden, F als Faradaykonstante, R als universeller Gaskonstante, T als Temperatur in Kelvin, A_E als Elektrodenfläche, c_0 als Konzentration der Redoxsubstanz in der Messlösung, D als Diffusionskoeffizient der Redoxsubstanz und ν als Spannungsvorschubgeschwindigkeit (Scanrate).

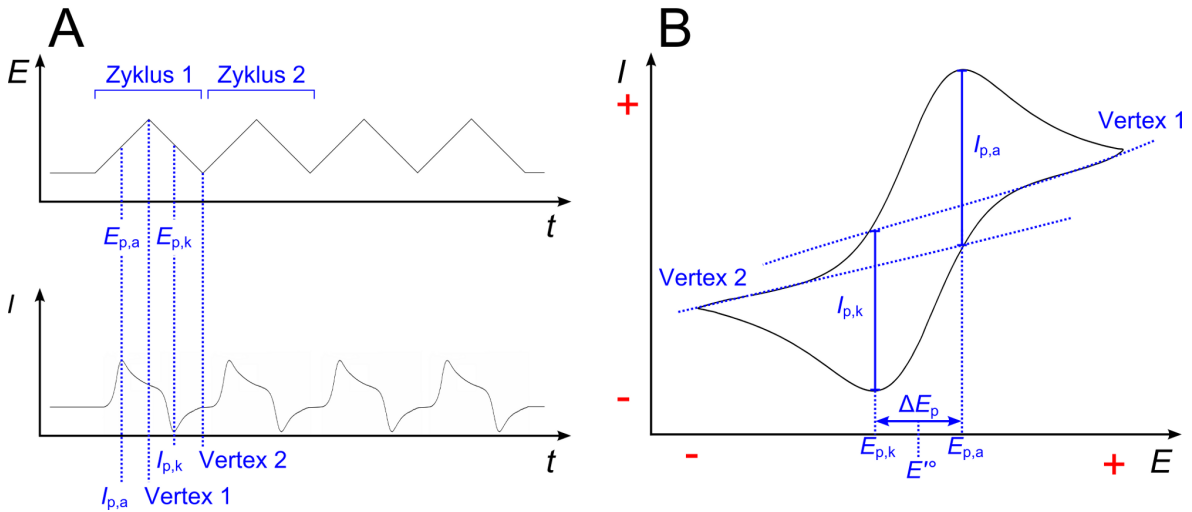


Abbildung 3: Zyklovoltammetrie oder Dreiecksspannung. A: Bei der Zyklovoltammetrie wird das Potential (E) zwischen zwei Extrema (Vertex 1, 2) geändert und die entsprechende Stromstärke (I) gemessen. Wegen der Form der Potentialkurve wird die Technik auch Dreiecksspannungsmethode genannt. **B:** Ein typisches Zyklovoltammogramm für eine reversible Redoxreaktion zeigt einen Stromstärkepeak für die Oxidation, den anodischen Peak ($I_{p,a}$), und einen für die Reduktion, den kathodischen Peak ($I_{p,k}$). Beide Peaks sind gleich hoch und zeigen im entsprechenden Potential eine Separation (ΔE_p), die sich idealerweise nach Formel 4 verhält. Das Formalpotential (E'°) entspricht bei gleichen Diffusionskoeffizienten für beide Redoxspezies dem arithmetischen Mittel der beiden Peakpotentiale ($E_{p,a}$, $E_{p,k}$).

Für eine reversible Redoxreaktion steigt nach Formel 3 die Spitzenstromstärke proportional mit der Wurzel der Scanrate an. Neben der gleichen Höhe der Strompeaks und der proportionalen Abhängigkeit zwischen Strompeakhöhe und der Wurzel der Scanrate können weitere Kriterien untersucht werden, um auf die Art der Reaktion zu schließen. Für eine reversible Reaktion gelöster Redoxsubstanzen sollte die Separation der beiden Stromstärkepeaks der Bedingung

$$\Delta E_p = \frac{2,3RT}{nF} = \frac{59 \text{ mV}}{n} \quad (4)$$

genügen, die sich aus der Nernstschen Gleichung (Formel 2) ergibt. Andernfalls muss von einer nicht oder nicht vollständig reversiblen Reaktion ausgegangen werden. Als ein weiteres Kriterium für eine reversible Reaktion gilt, dass sich die Peakseparation nicht ändert, wenn die Scanrate erhöht wird. In Tab. 2 sind die genannten Kriterien zusammengefasst und möglichen Reaktionsmechanismen zugeordnet. Diese Kriterien können auch durch Modifizierungen an der Elektrode, wie das immobilisieren von Molekülen, beeinflusst werden. Durch Beobachtung von Änderungen der CV-Diagramme können demnach Rückschlüsse auf Vorgänge an der Elektrode gezogen werden.

Aus der Lage der beiden Spitzenstromstärken lässt sich auch das formale Standardpotential E'^o wie folgt ableiten:

$$\frac{E_{p,a} - E_{p,k}}{2} = E'^o + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{D_R}{D_O} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

$E_{p,a}$ und $E_{p,k}$ sind dabei die Peakpotentiale des anodischen Stroms (Oxidation) und des kathodischen Stroms (Reduktion) und D_R und D_O die Diffusionskoeffizienten für die reduzierte und oxidierte Redoxspezies. Sind beide Diffusionskoeffizienten identisch, was für viele Redoxsubstanzen der Fall ist, dann vereinfacht sich der Zusammenhang zu

$$\frac{E_{p,a} - E_{p,k}}{2} = E'^o \quad (6)$$

1.3 Elektrochemische Impedanzspektroskopie

Die elektrochemische Impedanzspektroskopie findet vielfältige Anwendung in der Biosensorik. So wird sie bei der Untersuchung von Elektroden und Signalwandleroberflächen, bei der Verfolgung der Immobilisierung von biologischen Erkennungskomponenten, bei der Detektion von Analyten und der Untersuchung von Zellen und Geweben hinsichtlich Wachstum und

morphologischen Veränderungen eingesetzt.^[79] Die Impedanz Z ist der komplexe Widerstand in einem Wechselstromkreis. Analog dem ohmschen Gesetz ist dieser Widerstand der Quotient aus Wechselspannung und Wechselstrom, die sich in Abhängigkeit von der Zeit in der Regel sinusförmig ändern (Abb. 4A):

$$Z = \frac{u(t)}{i(t)} \quad (7)$$

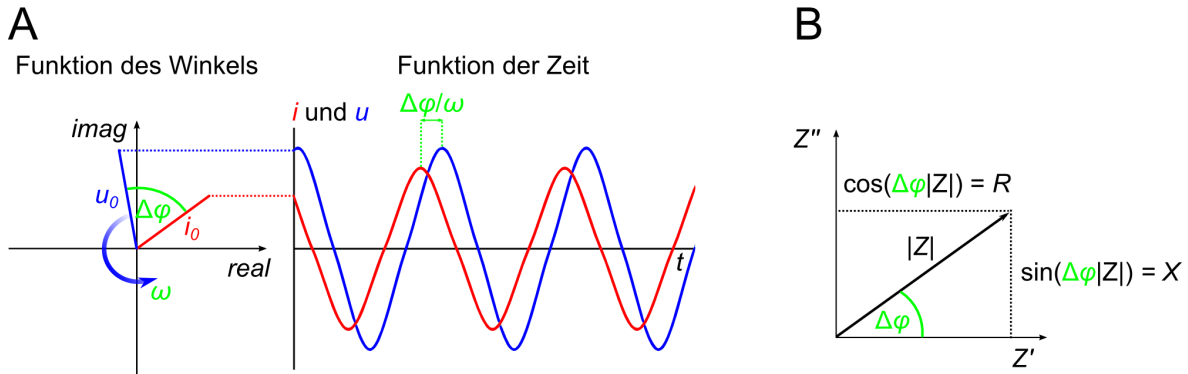


Abbildung 4: Transformation der realen Größen des Wechselstromkreises in komplexe Größen. **A:** Die zeitabhängigen Sinuskurven von Wechselspannung und -strom zeigen durch kapazitive oder induktive Widerstände eine Phasenverschiebung $\Delta\phi$. Sie lassen sich ins Zeigerdiagramm der komplexen Zahlenebene übertragen. Aus zeitabhängigen Funktionen werden Funktionen des Phasenwinkels. Die komplexen Größen besitzen einen imaginären Anteil (imag, y-Achse) mit der imaginären Einheit j und einen realen Anteil (real, x-Achse). **B:** Der komplexe Wechselstromwiderstand (Impedanz Z) kann entweder in Polarkoordinaten durch seinen Betrag $|Z|$ und $\Delta\phi$ angegeben werden oder in kartesischen Koordinaten durch den imaginären Anteil (Blindwiderstand X) und den realen Anteil (Wirkwiderstand R). Beide Formen lassen sich durch die Eulersche Relation (Formel 8) ineinander umwandeln.

Aus der Impedanz lassen sich zwei Informationen ableiten, zum einen das Verhältnis der Amplituden von Wechselspannung und -strom und zum zweiten die Phasenverschiebung zwischen beiden, die im Wechselstromkreis durch kapazitive und induktive Widerstände auftreten kann. Für die Vereinfachung weiterer Berechnungen wird die Impedanz nicht zeitabhängig, sondern in Abhängigkeit vom Phasenwinkel dargestellt. In Abbildung 4A ist die Transformation der realen Größen von Wechselspannung und -strom in komplexe Größen verdeutlicht. Die Impedanz kann sowohl in Polarkoordinaten durch ihren Betrag (Scheinwiderstand $|Z|$) und die Phasenverschiebung $\Delta\phi$ zwischen Spannung und Strom angegeben werden als auch in kartesischen Koordinaten durch den imaginären Anteil (Z'') und den realen Anteil (Z'). Der imaginäre Anteil wird als Blindwiderstand (Reaktanz, X) bezeichnet und besitzt die imagi-

näre Einheit j . Der reale Anteil wird auch Wirkwiderstand (Resistenz, R) genannt (Abb. 4B). Formel 9 zeigt wie die kartesische und die Polarkoordinatenform von Z ineinander umzurechnen sind, wobei die Eulersche Relation

$$e^{j\Delta\phi} = \cos\Delta\phi + j \sin\Delta\phi \quad (8)$$

zur Umrechnung der trigonometrischen Funktion in den komplexen Zahlenraum dient. Hierbei ist e die Eulersche Zahl, $\Delta\phi$ die Phasenverschiebung und j die imaginäre Einheit der komplexen Zahlen.

$$\begin{aligned} Z = \frac{u(t)}{i(t)} &= \frac{u_0 \sin(\omega t + \phi_u)}{i_0 \sin(\omega t + \phi_i)} = \frac{u_0 e^{j(\omega t + \phi_u)}}{i_0 e^{j(\omega t + \phi_i)}} = |Z| e^{j\Delta\phi} \\ &= |Z| (\cos\Delta\phi + j \sin\Delta\phi) = Z' + jZ'' = R + jX \end{aligned} \quad (9)$$

In Formel 9 ist ω die Kreisfrequenz ($2\pi f$; mit f als Frequenz), ϕ_u und ϕ_i die Phasenwinkel für Spannung und Stromstärke und $\Delta\phi$ die Differenz zwischen den Phasenwinkeln für Spannung und Stromstärke (Phasenverschiebung). Für die Phasenverschiebung gilt die Konvention, dass sie ein positives Vorzeichen erhält, wenn die Spannung dem Strom voraus eilt und ein negatives, wenn der Strom der Spannung voraus eilt.

Anders als der ohmsche Widerstand ist die Impedanz, also der Wechselstromwiderstand, abhängig von der Frequenz der angelegten Wechselspannung. Diese Abhängigkeit wird durch die Elemente des untersuchten Schaltkreises bestimmt. Die Gesamtimpedanz setzt sich aus den Einzelimpedanzen der Elemente zusammen. Anhand eines Impedanzspektrums lassen sich somit Rückschlüsse auf den Schaltkreis ziehen. Die zwei typischen Darstellungsformen für Impedanzspektren sind der Bode- und der Nyquistplot. Der Bodeplot beruht auf der Darstellung der Impedanz in Form von Polarkoordinaten. Der Betrag der Impedanz (Scheinwiderstand) und der Phasenverschiebung werden in Abhängigkeit von der Frequenz aufgetragen (Abb. 5A). Der Nyquistplot beruht dagegen auf der Darstellung der Impedanz in kartesischer Form. In ihm ist der negative imaginäre Anteil der Impedanz ($-Z''$) als Funktion des realen (Z') Anteils dargestellt (Abb. 5B). Jeder Datenpunkt ist bei einer definierten Frequenz aufgenommen. Der Nyquistplot erlaubt ein direktes Ablesen der elektrischen Parameter des untersuchten Systems. Ist andererseits ein Modell für das Messsystem bekannt, also ein Ersatzschaltbild, so können aus den Messdaten die Einzelimpedanzen der Schaltkreiselemente berechnet werden. Mittels Impedanzspektroskopie lassen sich auf diese Weise Änderungen in den Impedanzen einzelner Elemente des Messsystems analysieren.

Die Schaltkreise elektrochemischer Impedanzmessungen beinhalten als Elemente hauptsächlich ohmsche Widerstände, Kondensatoren, konstante Phasenelemente und Warburgimpedanzen.

zen. Um eine konkrete Messung auszuwerten, werden Ersatzschaltbilder aus diesen Elementen modelliert. Anhand dieser Modelle und dem Wissen über die Berechnung der Teilimpedanzen für die Schaltkreiselemente lassen sich aus den Messdaten die Impedanzen für jedes Element berechnen. Dafür muss nur beachtet werden, dass die Impedanz in einer Reihenschaltung gleich der Summe der Einzelimpedanzen ist und in Parallelschaltung ist der Kehrwert der Impedanz gleich der Summe der Kehrwerte der Einzelimpedanzen. Die üblichen Schaltkreiselemente sind mit ihren Eigenschaften in Tabelle 1 aufgeführt.

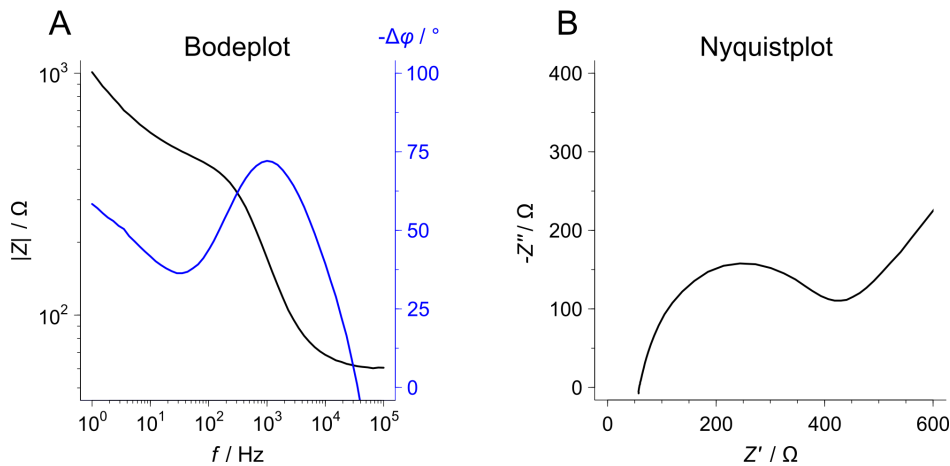


Abbildung 5: Darstellungsformen für Impedanzspektren. **A:** Der Bodeplot beruht auf der Polarkoordinatenform mit dem Betrag der Impedanz ($|Z|$) und der Phasenverschiebung ($\Delta\phi$) als Funktion der Frequenz. Die Achsen für $|Z|$ und f sind zur besseren Auflösung der Daten meist logarithmisch dargestellt. **B:** Der Nyquistplot beruht auf der kartesischen Form der Impedanz mit dem negativen imaginären Teil der Impedanz ($-Z''$) als Funktion des realen Teils (Z'). Jeder Datenpunkt entspricht einer Frequenz. Die abgebildeten Spektren sind typisch für reversible Redoxreaktionen an sauberen Goldelektroden (mit den in dieser Arbeit entwickelten Elektroden aufgezeichnet).

Ein bekanntes Schaltkreismodell, das die impedimetrische Analyse einer im Gleichgewicht befindlichen elektrochemischen Reaktion an einer Elektrode erlaubt, ist das Modell von Randles (Abb. 6A)^[80]. Es setzt sich zusammen aus einem ohmschen Widerstand für die Ladungsübertragung an der Elektrode, dem Ladungstransferwiderstand (R_{ct}). In Reihe dazu geschaltet ist ein Warburgelement, was die Diffusionsabhängigkeit der Reaktion widerspiegelt. Dazu parallel angeordnet ist ein Kondensator, der die Ionendoppelschicht an der Elektrode repräsentiert. In Reihe zu den genannten Elementen befindet sich noch ein ohmscher Widerstand, der Lösungsmittelwiderstand (R_s), mit dem der Widerstand des inneren Elektrolyten modelliert wird. Das klassische Randles-Modell^[80] muss je nach untersuchtem Messsystem angepasst werden. Ziel ist eine Minimierung der Differenz zwischen den Rohdaten einer Messung und

den mit Hilfe des Modells angepassten Daten. Dafür kann es nötig sein, dass Modell durch zusätzliche Elemente zu erweitern, oder auf Elemente zu verzichten, wie z. B. auf das Warburgelement, wenn keine Diffusionsabhängigkeit vorliegt. Durch Inhomogenitäten der Elektrodenoberfläche kann oft nicht von einem idealen Kondensator ausgegangen werden, weswegen er durch ein empirisches konstantes Phasenelement (CPE) ausgetauscht wird. Dieses Element zeigt auch eine konstante Phasenverschiebung wie ein Kondensator, jedoch nicht die idealen -90° , sondern einen Wert zwischen 0 und -90° . Der CPE-Koeffizient A ist vergleichbar mit der Kapazität der elektrochemischen Doppelschicht und entspricht ihr, wenn für den Parameter $n = 1$ gilt (siehe Formel in Tab. 1).

Tabelle 1: Definition, Phasenverschiebung und Frequenzabhängigkeit üblicher Schaltkreiselemente elektrochemischer Impedanzmessungen. ω ist die Kreisfrequenz mit $2\pi f$ (mit f als Frequenz), C ist die Kapazität, A und n sind die Parameter des konstanten Phasenelements (CPE), σ ist der Warburgkoeffizient, R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, z die Anzahl der Elektronen, die bei der Reaktion übertragen werden, F die Faradaykonstante, A_E die Elektrodenfläche, D_O und D_R die Diffusionskoeffizienten, c_O und c_R die Konzentrationen der oxidierten und reduzierten Spezies, R_0 der Diffusionswiderstand für $\omega = 0$ und l die Dicke der Diffusionsschicht.^[79]

Schaltkreiselement	Definition	Phasenverschiebung	Frequenzabhängigkeit
ohmscher Widerstand	$Z = R$	0°	nein
Kondensator	$Z_C = \frac{1}{j\omega C}$	-90°	ja
konstantes Phasenelement	$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^n}$	0 bis -90°	ja
Warburgelement (unendlich)	$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{\omega}} (1 - j)$ $\sigma = \frac{RT}{z^2 F^2 A_E \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_O} c_O} + \frac{1}{\sqrt{D_R} c_R} \right)$	-45°	ja
Warburgelement (endlich)	$Z_W = R_0 \frac{\tanh l \sqrt{j\omega/D}}{l \sqrt{j\omega/D}}$	0 bis -45°	ja

Die Messanordnung für Impedanzmessungen hängt vom Untersuchungsobjekt ab. Sollen die dielektrischen Eigenschaften von Zellen oder Zellgeweben untersucht werden, so kann eine Zweielektrodenkonfiguration bestehend aus Arbeits- und Gegenelektrode gewählt werden. In diesem Fall ist es nicht nötig die Arbeitselektrode auf einem definierten Potential zu halten. Durch Anlegen einer niedrigen Wechselspannung (10-100 mV) wird lediglich die Stromantwort auf diese Störung gemessen. Je nach Frequenzbereich können die Einflüsse der dielektrischen Zellmembranen, des Elektrolyten innerhalb und außerhalb der Zellen oder der Zwischenräume zwischen Zellen analysiert werden. Für eine genaue Analyse aller Elemente können Ersatzschaltbilder verwendet werden, die allerdings komplexer sein werden, als das klassische

Randles-Modell^[80]. Soll nun aber eine Redoxreaktion an der Elektrode untersucht werden, so muss das Potential an der Arbeitselektrode kontrolliert werden. Präzise gesagt, damit solch eine Reaktion überhaupt stattfindet, muss an der Arbeitselektrode ein Gleichspannungssignal angelegt werden, das dem formalen Standardpotential der Redoxsubstanz entspricht (offenes Zellpotential). Dafür wird wie bei der Zyklovoltammetrie eine Dreielektrodenkonfiguration aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode gewählt, wobei der Strom zwischen Arbeits- und Gegenelektrode fließt und das Potential zwischen Arbeits- und Referenzelektrode kontrolliert und konstant gehalten wird (Abb. 2). Das Gleichspannungssignal wird dann für die Impedanzmessung durch ein Wechselstromsignal mit niedriger Amplitude überlagert und die Stromantwort auf diese Störung verfolgt. Je nach Frequenzbereich können dann ebenso die Einflüsse der einzelnen Elemente des Schaltkreises, wie z. B. des Ladungstransferwiderstands für die Redoxreaktion, mittels Modellen wie dem von Randles^[80] analysiert werden.

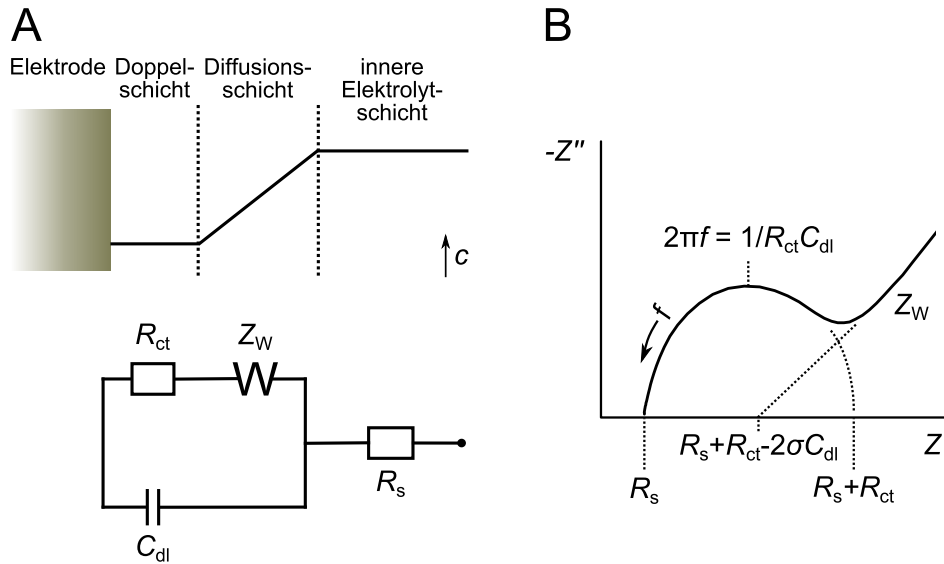


Abbildung 6: Randles Ersatzschaltbild. **A:** Das klassische Schaltkreismodell von Randles^[80] besteht aus Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) in Reihe zu einem Warburgelement (Warburgimpedanz Z_W). Beide Elemente befinden sich in einer Parallelschaltung mit einem Kondensator (dl für *double layer*). In Reihe zu dieser Parallelschaltung befindet sich der Lösungsmittelwiderstand R_s . Das Schaltkreiselement des Kondensators stellt die Ionendoppelschicht an der Elektrode dar, die sich durch Anlegen eines Potentials ausbildet. Der Ladungstransferwiderstand modelliert die Redoxreaktion an der Elektrode und das Warburgelement das Auftreten einer Diffusionsschicht. Der Lösungsmittelwiderstand gibt die innere Elektrolytlösung wieder. **B:** Der Nyquistplot erlaubt ein direktes Ablesen der Parameter des Ersatzschaltbildes.

Um Impedanzdaten mit Modellen genauer zu analysieren, ist es essentiell ungewollte Einflüsse auf das Messsystem zu vermeiden. Die Stabilität des Messsignals muss gewährleistet

sein und Umgebungsbedingungen, wie z. B. die Temperatur, müssen konstant gehalten werden. Weiterhin ist es wichtig, dass sich das System linear verhält. Dies bedeutet, dass das Wechsellspannungssignal klein genug sein muss, um eine Linearität zwischen Spannung und Stromstärke zu gewährleisten, ergo eine Unabhängigkeit der Impedanz von der Spannungsamplitude. Die Amplituden von Spannung und Stromstärke zeigen im Wechselstrom keine Linearität wie im Gleichstrom. Nur wenn die Änderungen sehr klein gehalten werden, kann in diesem Bereich von einer quasi-Linearität ausgegangen werden.^[79]

Ein weiterer Einfluss, der unterbunden werden muss, ist der der Gegenelektrode. Damit die Gesamtimpedanz nicht von der Impedanz der Gegenelektrode beeinflusst wird, sollte die Oberfläche der Gegenelektrode wenigstens zehnmal größer sein, als die der Arbeitselektrode^[81]. Dies lässt sich damit erklären, dass die Kapazität der Ionendoppelschicht an der Elektrode mit der Fläche steigt. Mit zunehmender Kapazität bzw. mit zunehmendem A sinkt die Impedanz des Kondensators bzw. des CPEs (siehe Tab. 1) und somit auch der Einfluss der Gegenelektrode auf die Gesamtimpedanz.

1.4 Kopplung von Proteinen an die Signalwandler

Eine enge Kopplung der biologischen Erkennungskomponente an den Signalwandler ist entscheidend für eine gute Signalweiterleitung. Bei der Immobilisierung von Proteinen als biologische Erkennungskomponenten an einen Signalwandler müssen gewisse Bedingungen beachtet werden. Proteine dürfen durch die Immobilisierung nicht denaturiert werden, ihre biologische Funktion (z. B. katalytische Aktivität bei Enzymen) soll erhalten bleiben, es müssen ausreichende Mengen gleichförmig immobilisiert werden und stabil auf dem Signalwandler verbleiben und die Immobilisierungsstrategie muss reproduzierbar sein. Diverse Immobilisierungsmethoden sind beschrieben, die versuchen die angestrebten Bedingungen zu erfüllen^[82]. Sie lassen sich grob in kovalente und nicht-kovalente Methoden einteilen.

Zu den kovalenten Techniken zählen klassische Chemoligationsstrategien wie die Bildung von Amidbindungen zwischen Proteinaminogruppen und NHS-Aktivestern auf der Oberfläche, die Bildung von Iminbindung zwischen Aminogruppen des Proteins und Aldehydgruppen auf der Oberfläche, die nukleophile Ringöffnung von Epoxiden durch Amino- oder Thiolgruppen des Proteins oder die Bindung von Cysteinresten des Proteins an Maleimidgruppen auf der Oberfläche. Diese Chemoligationsmethoden erfordern immer eine Vorbereitung der Signalwandleroberfläche mit den entsprechenden reaktiven Gruppen. Diese können z. B. relativ unkompliziert gekoppelt an Thiole, Sulfide, Disulfide oder Liponsäuren durch Chemisorption von sich selbst-organisierenden Monoschichten (*self-assembled monolayer*, SAM) aufgebracht werden. Die Bildung von SAMs auf Gold erfolgt z. B. ohne weitere Einflussnahme durch das Eintauchen einer Goldoberfläche in eine Verdünnung einer Organoschwefelverbindung. Nach

einer gewissen Zeit hat sich durch Chemisorption zwischen den Schwefelkopfgruppen und Gold ein orientierter, hoch geordneter monomolekularer Film der Organoschwefelverbindung ausgebildet^[83,84]. Es können aber auch Schichten aus Silanen genutzt werden, um funktionelle Gruppen für die Proteinimmobilisierung auf die Sensoroberfläche zu bringen. Ein Beispiel ist die Immobilisierung von *E. coli*-spezifischen Antikörpern an Epoxysilane durch Ruan und Yang *et al.*^[8]. Silane lassen sich durch Silanisierung auf Glas, Glimmer und Metalloxide wie Indiumzinnoxid aufbringen. Hydroxylgruppen dieser Substrate gehen mit Alkoxy-, Chlor- oder Aminresten der Silane kovalente Bindungen ein. Eine weitere kovalente Immobilisierungsstrategie ist die bioorthogonale ortsspezifische Chemoligation. Dabei werden organochemische Reaktionen wie die Staudinger oder die Diels-Alder-Ligation und Click-Chemie genutzt, um Proteine in einer bestimmten Orientierung zu binden ohne ihre biologische Funktion zu beeinträchtigen. Allerdings müssen die Proteine vorher ortsspezifisch modifiziert werden. Bei der Click-Chemie z. B. mit einem Azidrest.^[85]

Die einfachste nicht-kovalente Methode zur Proteinimmobilisierung ist die Adsorption, bei der Proteine durch hydrophobe, hydrophile oder elektrostatische Wechselwirkungen auf der Signalwandleroberfläche binden. Dabei können aber Denaturierungsprozesse auftreten und durch die Reversibilität des Prozesses kann die Stabilität des Biosensors beeinträchtigt werden. Die Ankopplung von Proteinen durch Adsorption kann mittels Quervernetzung, beispielsweise mit Glutaraldehyd, unterstützt werden^[86]. Proteine können aber auch auf biologische Weise nicht-kovalent immobilisiert werden, durch Wechselwirkungen zwischen biologischen Molekülen wie z. B. Biotin und Streptavidin^[82]. Dafür müssen die Proteine zuvor mit Biotin und die Signalwandleroberfläche mit Streptavidin markiert werden. Eine nicht-kovalente Methode, um Proteine relativ stabil und biologisch aktiv auf die gewünschte Oberfläche zu bringen, ist der Einschluss in oder die Bindung an ein Polymer. Es werden dazu auch leitende Polymere verwendet. Diese werden durch elektrochemische Polymerisation auf der Signalwandleroberfläche gebildet. Um Proteine in diese Polymere einzuschließen, werden sie einfach während der Polymerisation zugegeben. Eine Bindung an die Polymere kann aber auch nach der Polymerisation durch aktive funktionelle Gruppen des Polymers erfolgen. Das leitende Polymer kann die elektrische Ladung, die bei einer biochemischen Reaktion des immobilisierten Proteins auftritt, an den Signalwandler übertragen^[87]. Eine andere Strategie, um Proteine effizient und mit hoher biologischer Aktivität zu immobilisieren, ist der Einschluss in Polyelektrolytkomplexe aus Polyanionen (z. B. Polystyrolsulfonat) und Polykationen (z. B. Poly-L-Lysin)^[88]. Durch ihre selektive Permeabilität sind Polyelektrolytmembranen geeignet, um störende Moleküle in Analytproben auszuschließen oder unspezifische Adsorptionen zu verhindern.

1.5 Signalverstärkung für elektrochemische Biosensoren

Für den Fall, dass die Bindung des Analyten oder dessen katalytischer Umsatz nicht zu einem ausreichenden Signal führt, wurden verschiedene Strategien zur Signalverstärkung entwickelt. Oft kommen dabei Enzyme, wie die Peroxidasen oder Phosphatasen zum Einsatz. Sie binden zusätzlich, z. B. via Kopplung an Antikörper, an den Analyten und katalysieren Redoxreaktionen, die eine Präzipitatbildung^[8,15,67,89] hervorrufen, oder sie verstärken den Stromfluss durch katalytischen Umsatz von Zwischenprodukten (z. B. durch Substratkanalisierung, dem kontrollierten Weiterleiten von Zwischenprodukten von Enzym zu Enzym)^[71,90]. Eine andere Methode der Signalverstärkung ist das Redoxzyklisieren (*redox cycling*), bei dem die elektroaktiven Spezies an nahe beieinander liegenden Elektroden nach der Oxidation bzw. Reduktion wiederholt regeneriert werden^[91]. Da somit ein Molekül mehrmals an der Elektrode reagieren kann, bis es sich von der Elektrode löst, wird sein Signal verstärkt. Auch Nanopartikel werden oft genutzt, um das primäre elektrochemische Signal zu verstärken^[92]. Kim und Lee *et al.* nutzten z. B. Goldnanopartikel zur Detektion eines Markerproteins für Prostatakrebs. Die Nanopartikel waren dafür mit antigenspezifischen Antikörpern bedeckt, welche zusätzlich an den, auf dem Biosensor immobilisierten, Analyten banden^[93].

1.6 Tumormarker Tenascin C als Analyt für die biosensorische Diagnostik

Tenascin C (TnC) ist ein Protein der extrazellulären Matrix. Die Größe eines Monomers von TnC beträgt je nach Spleißform ca. 190-300 kDa. Es besteht vom N- zum C-Terminus aus $14\frac{1}{2}$ EGF-ähnlichen Domänen, gefolgt von 8 Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domänen, wobei sich zwischen Domäne 5 und 6 bis zu 9 zusätzliche alternativ-gespleißte Fibronectin-III-ähnliche Domänen befinden (Abb. 7A). Der C-Terminus besteht aus einer globulären Domäne ähnlich des C-Terminus der β - und γ -Ketten von Fibrinogen. TnC tritt hauptsächlich als Hexamer auf, wobei die Monomere durch ihre am N-Terminus befindliche TnC-Assemblierungsdomäne verbunden sind. Diese Domäne besitzt Cysteinreste, über die Disulfidbrücken gebildet werden können, was die Hexamere stabilisiert. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind die Hexamere als sechsarmige Gebilde sichtbar, deren Monomere sich symmetrisch vom zentralen Verbindungspunkt der N-Termini ausbreiten (Abb. 7B).^[94,95]

Tenascin C besitzt verschiedenste, teilweise auch gegensätzliche Funktionen, die einerseits durch die unterschiedlichen Spleißformen und das zeitliche Expressionsmuster von TnC und andererseits durch unterschiedliche TnC-Rezeptoren auf den Zellen bedingt sind. Zu den TnC-Rezeptoren zählen Integrine, Contactin, Annexin II und Heparansulfat. TnC zeigt sowohl adhäsive als auch repulsive Aktivität. Im Nervensystem besitzen die EGF-ähnlichen Domänen

beispielsweise einen repulsiven Effekt für die Ausbreitung von Zellen und das Axonwachstum, wohingegen die Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domänen 1-3 die Ausbreitung von Zellen und das Neuritenwachstum befördern. Die Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domänen 4 und 5 haben wiederum einen repulsiven Effekt auf das Wachstum von Axonen.^[95–97]

Tenascin C wird hauptsächlich während der Entwicklung eines Organismus oder während Wundheilungsprozessen exprimiert, jedoch nicht im adulten, gesunden Status^[97]. Ausnahmen sind Tumorgewebe. TnC ist stark exprimiert in soliden Tumoren wie Glioma oder Brustkarzinoma^[98,99]. Das macht es zu einem geeigneten Tumormarker und somit auch zu einem geeigneten Analyten für die biosensorische Tumordiagnostik. Es befördert sowohl die Proliferation als auch die Migration von Tumorzellen^[100]. Außerdem korreliert seine Expressionsstärke mit dem Tumorgrad. Je höher die Expression, desto schlechter die Prognose und desto schneller können Rezidive entstehen^[99,100].

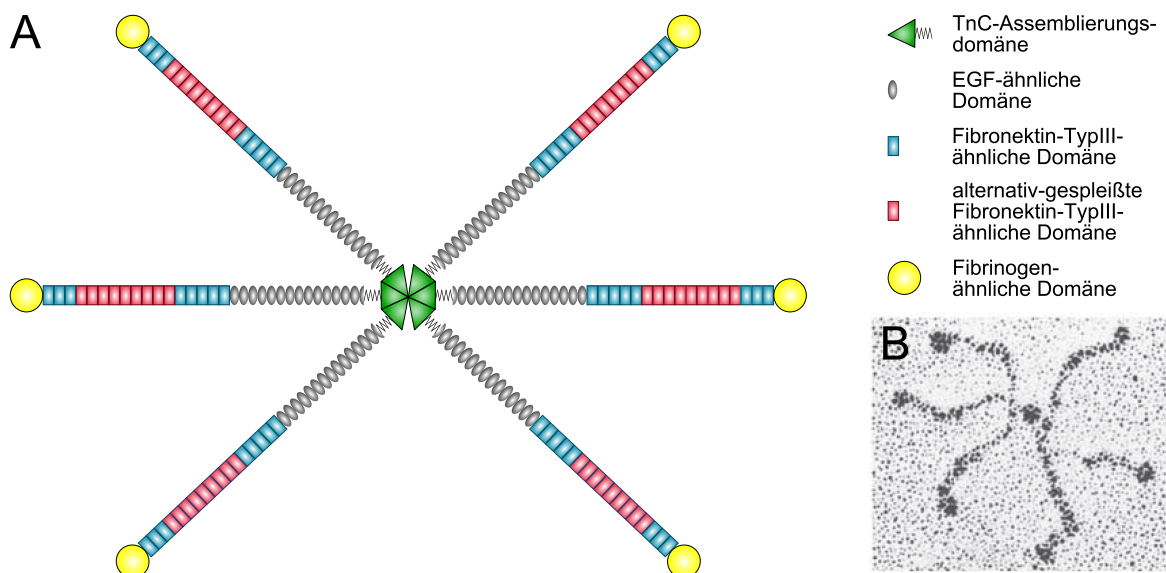


Abbildung 7: Struktur von Tenascin C (TnC). **A:** Das TnC-Hexamer besteht aus sechs TnC-Monomeren, die durch ihre N-terminale TnC-Assemblierungsdomäne verbunden sind. Jedes Monomer besitzt $14\frac{1}{2}$ EGF-ähnliche Domänen, 8 konstante Fibronectin-TypIII-ähnliche Domänen und 9 alternativ-gespleißte (zwischen den konstanten Domänen 5 und 6) und eine am C-Terminus gelegene globuläre Fibrinogen-ähnliche Domäne. **B:** Die elektronenmikroskopische Aufnahme von Orend und Chiquet-Ehrismann zeigt das TnC in seinem natürlichen Zustand als Hexamer (modifiziert nach^[99]).

1.7 DCC-Rezeptor als Zelloberflächenprotein für die Detektion ganzer Zellen

Die Abkürzung DCC steht für *Deleted in Colorectal Cancer* und rührt von seiner Entdeckung als Tumorsuppressorgen her. Die Beobachtung, dass ca. 70 % aller primären kolorektalen Karzinome einen Allelverlust von Chromosom 18q zeigen, sowie somatische Mutationen auf einem bestimmten Abschnitt des Chromosoms, führte zur Identifizierung des *DCC* Gens^[101]. Es kodiert für ein Typ-I-Transmembranglykoprotein mit einer Größe von 175-190 kDa. Aufgrund von alternativem Spleißen existieren verschiedene Isoformen. Sie besitzen alle eine einzige Transmembrandomäne, eine große extrazelluläre Domäne ähnlich den extrazellulären Domänen in der NCAM-Proteinfamilie (*Neural Cell Adhesion Molecule*) mit vier immunglobulin-ähnlichen und sechs Fibronectin-TypIII-ähnlichen Motiven und eine kleine zytoplasmatische Domäne. Über die extrazelluläre Domäne können die DCC-Moleküle und somit DCC-tragende Zellen detektiert werden.^[102]

DCC fungiert als Rezeptor für die Netrin-vermittelte Signalübertragung zusammen mit anderen Rezeptoren wie Robo, UNC5H und A2b^[103–105]. Es bindet Netrin 1^[106]. Netrine sind wichtig für die Bestimmung der Richtung und der Weite der Migration von Zellen und des Axonwachstums im sich entwickelnden Nervensystem. Wird Netrin-1 von DCC gebunden, so werden durch den Rezeptor das Rac-1 Protein und die ERK-1/2 Signalwege aktiviert. Generell ist die Bindung von Netrin-1 an DCC ein Überlebenssignal für die Zelle. So konnte beobachtet werden, dass bei Anwesenheit von Netrin-1 DCC intrazellulär gespalten wird, was Apoptose induziert^[107]. Daher wird der DCC-Rezeptor auch zu den *dependence*-Rezeptoren gezählt, die ihre zelluläre Aktivität ausüben, wenn der Ligand gebunden wird und bei Abwesenheit des Liganden Apoptose induzieren. DCC wird sowohl während der Entwicklung, als auch im adulten Stadium am stärksten im Nervensystem exprimiert^[101,106].

1.8 Zielsetzung für die Doktorarbeit

Herkömmliche diagnostische Methoden in der Pathologie und Medizin beruhen hauptsächlich auf zeit- und ressourcenintensiven Methoden, wie anatomischen Untersuchungen, histologischen und zytologischen Färbemethoden, oder immunologischen und biochemischen Testverfahren. Ziel der Doktorarbeit ist die Entwicklung von innovativen elektrochemischen Biosensoren, die die herkömmlichen Techniken erweitern oder ersetzen können. Anhand von ausgewählten Analyten sollen das Potential und die Anwendbarkeit solcher Biosensoren beispielhaft demonstriert werden.

Zuerst sollen Elektrodenarrays auf Glaschips als Basis der Biosensoren entworfen und im Reinraum gefertigt werden. Nach einer Erweiterung der Elektrodenchips um Messkammern,

Deckel und Referenzelektroden sollen die Elektroden des Chips und das Referenzsystem mittels elektrochemischer Impedanzspektroskopie, Zyklovoltammetrie und Rasterkraftmikroskopie charakterisiert werden. Herstellungs- und Messparameter müssen hinsichtlich stabiler, reproduzierbarer Messergebnisse festgelegt werden.

Danach sollen auf Basis der Elektrodenarraychips Biosensoren aufgebaut werden, um das Tumormarkerprotein Tenascin C (TnC) zu detektieren. Zur Detektion von TnC werden verschiedene Strategien getestet, bei denen entweder die Antikörper gegen Tenascin C oder Tenascin C selbst auf den Arbeitselektroden immobilisiert werden. Für die Immobilisierung der Proteine werden die Oberflächen der Arbeitselektroden zuerst mittels Thiolchemie funktionalisiert. An die Thiole werden die Antikörper oder Tenascin C kovalent gekoppelt. Ziel ist die Formierung eines in seiner Aktivität stabilen biologischen Erkennungsfilms. Dafür werden verschiedene Thiole bezüglich der Stabilität der von ihnen durch Chemisorption gebildeten selbst-assemblierenden Monoschichten getestet. Sowohl die Thiolfunktionalisierung, als auch die Proteinenkopplung an die Thiole und die Analytdetektion sollen elektrochemisch verfolgt werden. Für die TnC-Detektion wird ein indirektes, ein kompetitives und ein *Sandwich*-Verfahren gewählt.

Neben der Detektion von Proteinen, wie Tenascin C, wäre eine Detektion ganzer Zellen eine vielversprechende Erweiterung des Spektrums der Möglichkeiten biosensorischer Analytik. Bisher existieren zwar eine Reihe von Biosensoren zur Detektion von Bakterienzellen^[8–12]. Sensoren für die Detektion ganzer eukaryotischer Zellen beschränken sich jedoch auf eine überschaubare Anzahl, die meist Suspensionszellen wie Erythrozyten^[108] oder Tumorzellen (Leukämiezelllinien^[14], zirkulierende Tumorzellen^[14]) detektieren und dies auch hauptsächlich mikroskopisch^[13,14,109]. Im letzten Abschnitt der Doktorarbeit soll aufbauend auf dem zur Proteindetektion entwickelten Biosensor ein Sensor für ganze Zellen entwickelt werden. Die Machbarkeit der Vorhabens soll anhand von Polystyrolpartikeln als Zellersatz getestet werden, um im Anschluss die Zellen der humanen Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cell line*) zu detektieren. Die Erkennung soll jeweils durch Partikel-, bzw. Zelloberflächenproteine realisiert werden. Für die Partikel sind dies Antikörper, mit denen sie beschichtet sind und für die HEK293-Zellen sind es DCC-Rezeptoren (*Deleted in Colorectal Cancer*), die diese durch gentechnische Veränderung verstärkt exprimieren. Als Basis für die Biosensoren sollen sowohl die für die Proteindetektion entwickelten Elektrodenarraychips dienen, als auch Sensoren, die eine Durchflussapplikation ermöglichen.

2 Material

„Gebt mir einen Hebel, der lang genug, und einen Angelpunkt, der stark genug ist, dann kann ich die Welt mit einer Hand bewegen.“

(Archimedes 287-212)

2.1 Antikörper

- F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper (polyklonal, mit Peroxidase) von Dianova Immundiagnostik
- F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper (polyklonal, mit Cy2) von Dianova Immundiagnostik
- F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (polyklonal, mit Peroxidase) von Dianova Immundiagnostik
- F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (polyklonal, mit Cy2) von Dianova Immundiagnostik
- F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (polyklonal, mit Peroxidase) von Dianova Immundiagnostik
- Kaninchen-anti-CD133-Antikörper (polyklonal) von Santa Cruz Biotechnology Inc.
- Maus-anti-Tenascin-C-Antikörper (monoklonal) von Millipore
- Maus-anti-β-Aktin-Antikörper (monoklonal) von Sigma-Aldrich
- Ziege-anti-DCC-Antikörper (polyklonal) von Sigma-Aldrich
- Ziege-anti-Tenascin-C-Antikörper (polyklonal) von Santa Cruz Biotechnology Inc.

2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck
2-Propanol	Merck
3-Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich
6-Mercaptohexanol	Sigma-Aldrich
11-Mercaptoundekansäure	Sigma-Aldrich
Aceton	Merck
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung	Carl Roth GmbH
APS (Ammoniumpersulfat)	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Calcein-AM (5 mM in DMSO)	Invitrogen
<i>Casy[®]ton</i>	Schärfesystem
Cysteamin	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
(4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid)	
Desoxycholsäure	Carl Roth GmbH
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	Gibco Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem
EDC	Sigma-Aldrich
(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)- carbodiimid)	
EDTA	Merck
(Ethylendiamintetraessigsäure)	
Entwicklerlösung AR 300-35	Allresist
Entwicklerlösung mr-Dev 600	Allresist
Ethanol, absolut	Merck
Ethanolamin	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco Invitrogen
Formaldehyd (37 %)	Merck
Geneticin (50 mg/ml)	Gibco Invitrogen
Gentamicin (50 mg/ml)	Gibco Invitrogen
Glutamax (200 mM)	Gibco Invitrogen
Glyzerin	Merck

Glyzin	Merck
Hygromycin (50 mg/ml)	Carl Roth GmbH
IGEPAL	Sigma-Aldrich
Kaisers Glyzeringelatine	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumhexacyanoferrat II ($K_4[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich
Kaliumhexacyanoferrat III ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Merck
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumtetraborat	Merck
NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid)	Sigma-Aldrich
nicht-essentielle Aminosäuren (200 mM)	Gibco Invitrogen
<i>Nowa</i> -Detektionslösung	MoBiTec
PBS pH 7,4	Gibco Invitrogen
ohne Kalzium/Magnesium (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	Gibco Invitrogen
Polystyrolpartikel	Kisker
Ponceau-S-Färbelösung	Sigma-Aldrich
Positivlack AR-P 3510	Allresist
Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich
<i>Roti Nanoquant</i> (Bradford-Reagenz)	Carl Roth GmbH
Schwefelsäure (95 %)	Carl Roth GmbH
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Silberkleber <i>EPO-TEK® H20E</i>	Epoxy Technology, Inc.
Silikon <i>Loctite 5366</i>	Loctite
<i>Spectra™ Multicolor</i>	Fermentas GmbH
<i>Broad Range Protein Ladder</i>	
SU8-Lack (SU8 2)	micro resist technology
TEMED	Carl Roth GmbH
Tenascin C (0,1 mg/ml)	Millipore
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Merck

Tween 20
Wasserstoffperoxid (30 %ig)

Carl Roth GmbH
Merck

2.3 Enzyme

Enzym
Trypsin/EDTA
(0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA)
Accutase

Hersteller
Sigma-Aldrich

PAA Laboratories

2.4 Geräte

Gerät
ÄKTATM prime plus
Analysenwaage *Kern EW MC1*
Analysenwaage *Analytic Ac 210 S*
Bandsäge und Sägebänder
Belichter *MA6*
Bioscope Catalyst (AFM)
CASY[®] TTC-Zellzählgerät
Compact Stat (Potentiostat)
Dremel Digital 400
Eisflockenbereiter *AF-80*
Eisschrank *Sadia/ Exquisit/*
(*86L ULT-Freezer*)
Elektrodenarrayadapter

ELISA-Reader Sunrise
Photokamera
Photomasken (Chrommasken)
Gasbrenner *Gasprofi 2*
Geldokumentationssystem *ChemiDoc XRS*
HiMUX32 (Multiplexer)
Heizplatte *HT 300*
HMDS-Heizplatte
Inkubator *IH 50*
Kühlschrank *Profiline*

Hersteller
GE Healthcare
Kern GmbH
Satorius
DRAMET
SÜSS Microtec
Bruker AXS
Schärfe System
Ivium Technologies
Dremel
Scotsman
Thermo Cryotechnics, Thermo Life Sciences

Molekularbiologisch-biochemische
Prozesstechnik
Tecan
Kodak digital sciences
ML&C GmbH
WLD-Tec GmbH
Bio-Rad
Ivium Technologies
Minitüb
SSE GmbH
Noctua GmbH
Liebherr

<i>Laser-Scanning-Mikroskop</i> (<i>Eclipse TE 2000-U</i> mit LSM-Aufsatz <i>C1</i>)	Nikon
Lötkolben	Weller
Magnetrührer <i>RCT Basic</i>	Kika Werke
Makroskop <i>Z16 APO</i>	Leica
Mikroskop <i>Eclipse E 200/600</i>	Nikon
Mikroskop <i>FRT MicroSpy[®] Topo</i>	Fries Research & Technology
Minizentrifuge <i>DW 41BR</i>	Carl Roth GmbH
Mixer <i>Bio Vortex V1</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH
Mixer <i>Vortex VM3 CAT</i>	Zipperer GmbH
<i>NanoScope V</i> -Reglereinheit (für das AFM)	Bruker AXS
Nasschemiebänke	Arias GmbH
PAGE-Apparatur <i>Mini Protean III</i>	Bio-Rad
PAGE-Netzgerät <i>E831</i>	Consort
PC	Dell
pH-Meter <i>pH211 Microprozessor</i>	Hanna Instruments
Pipetten (2,5; 10; 20; 100; 200; 1000; 5000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe <i>Pipetus akku</i>	Hirschmann Laborgeräte GmbH
Reinstwasseranlage <i>Astacus</i>	MembraPure
Rotationsbeschichter <i>SB15</i>	SSE GmbH
Scanner <i>HP Scanjet 8200</i>	Hewlett-Packard
Schüttelinkubator/Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf
Schüttler <i>Stuart gyro-rocker SSL3</i>	Keison Products
Dosierer <i>Performus V</i>	EFD International
Sputteranlage <i>BAE</i>	Wiemer EM-Service
Sterilbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus
Stickstoffgenerator	INMATEC
Stickstofftank <i>MVE Cryosystems 6000</i>	German-cryo
Taumler <i>Heidolph Polymax 1040</i>	Heidolph Instruments
<i>Thermocycler Mastercycler gradient</i>	Eppendorf
Tischzentrifuge <i>Biofuge pico</i>	Heraeus
Ultraschallsonde	Dr. Hielscher GmbH
Vakuumpumpe <i>CVC 2000</i>	Vacuubrand
Wasserbad <i>Medingen W12</i>	Preiss-Daimler
Western Blot <i>Trans-Blot Semi Dry</i>	Bio-Rad
Zentrifugen <i>Z383K</i> und <i>Z400K</i>	Hermle

2.5 Kits

Kit	Hersteller
<i>AEC-Staining-Kit</i>	Sigma-Aldrich

2.6 Metalle

Metall	Hersteller
Ag-Draht (\varnothing 0,5 mm)	GoodFellow
<i>Au-Target</i>	Bal-Tec
<i>Cr-Target</i>	MaTecK
<i>ITO-Target</i>	MaTecK
<i>Pt-Target</i>	Bal-Tec

2.7 Puffer und Lösungen

4 %ige Formaldehydlösung	<ul style="list-style-type: none"> • 4 % Formaldehyd in PBS
Blocklösung (Immunzytochemie)	<ul style="list-style-type: none"> • 3 % BSA (w/v) • 0,1 % Triton (v/v) in PBS
Blocklösung (<i>Western Blot</i> und <i>Dot Blot</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 5 % Magermilchpulver (w/v) in TBST
Lauf-/Elektrodenpuffer 10 x	<ul style="list-style-type: none"> • 0,25 M Tris-Base • 1,92 M Glycin • 34 mM SDS in Reinstwasser
PBST	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 % Triton-X-100 (v/v) in PBS
Piranha-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> • 2 Teile Schwefelsäure (95 %) • 1 Teil Wasserstoffperoxid (30 %)

RIPA-Puffer (pH 7,5)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,15 M NaCl • 0,1 M EDTA • 0,5 % Desoxycholsäure (w/v) • 0,1 % SDS (w/v) • 1 % IGEPAL (w/v) • 50 mM Puffer (Tris-Base) pH 8 in Reinstwasser
SDS-Probenpuffer (5 x; pH 6,8)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,45 mM Bromphenolblau • 0,17 M SDS • 0,64 M 2-Mercaptoethanol • 5,43 M Glyzerin • 0,3 M Tris-Base (pH 6,8) in Reinstwasser
<i>Stripping</i> -Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 M 2-Mercaptoethanol • 2 % SDS (w/v) in TBST
TBST (pH 8)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,15 M NaCl • 50 mM Tris-Puffer (26,8 mM Tris-Base, 23,2 mM Tris-HCl) • 0,75 % Tween 20 (v/v) in Reinstwasser
Transferpuffer (pH 8,4)	<ul style="list-style-type: none"> • 25 mM Tris-Base • 47 mM Glyzin • 10 % Methanol (v/v) in Reinstwasser

2.8 Software

Software

Adobe[®] *Photoshop*[®] CS2 9.0
AutoCAD 2009
Excel[®] 2003/2007
EZ-C1 und *EZ-C1 Viewer* 3.40

Hersteller

Adobe Systems GmbH
 Autodesk
 Microsoft Corporation
 Nikon

<i>FRT Aquire (Inspector)</i>	Fries Research & Technology GmbH
<i>FRT Mark III</i>	Fries Research & Technology GmbH
<i>Gimp 2.6.11</i>	Spencer Kimball, Peter Mattis und das GIMP-Entwicklerteam
<i>ImageJ 1.44p</i>	Wayne Rasband, National Institutes of Health (USA)
<i>IviumSoft 1.922</i>	Ivium Technologies
<i>Lucia G bzw. G/F 4.80</i>	Laboratory Imaging Ltd.
<i>Magellan 3.11/V 6.5</i>	Tecan
<i>Matlab 7.0.1 R14</i>	The Mathworks
<i>MiKTeX</i>	Christian Schenk, www.miktex.org
<i>Quantity One 4.4.0</i>	Bio-Rad
<i>R 2.13.1</i>	The R Foundation for Statistical Computing
<i>termaker</i>	Pascal Brachet, www.xmlmath.net/texmaker

2.9 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
24-well-Platten	Greiner Bio-One
96-well-Platten (ELISA)	Greiner Bio-One
Borofloat 49 x 49 x 1 mm ³ (Glassubstrat)	DocterOptics
Deckgläser (Ø 10 mm)	Merck
Dosiernadeln	GLT
Kabel	Farnell
Kulturflaschen Cellstar (25 und 75 cm ²)	Greiner Bio-One
MCX-Stecker und -Buchsen	Farnell
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pipettenspitzen	Treff AG
Platine (Platinenmaterial FR4)	PCB-Pool
Polypropylenröhrchen (15 und 50 ml)	TPP Techno Plastic Products AG
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One
Reinraumkleidung	Dastex GmbH
Spritze (<i>Disposable Reservoir System 3cc</i>)	EFD Nordson
<i>Sticky-Slide I 0.2 Luer</i>	ibidi GmbH

Vinylhandschuhe
Whatman-Papier
Zellschaber

Rösner-Mautby Meditrade GmbH
Bio-Rad
TPP Techno Plastic Products AG

3 Methoden

„Zur Erforschung der Wahrheit bedarf es notwendig der Methode.“

(René Descartes 1596-1650)

3.1 Zellkulturtechnik

3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

Als Zelllinien werden HEK293 (*human embryonic kidney cell line*, aus dem 293FT-Cell-Line-Kit von Invitrogen) und HEK293_{DCC-eCFP} verwendet. Letztere Zelllinie war im Labor für Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik aus den HEK293-Zellen durch stabile Transfektion mit einem Vektor auf dem das Fusionsgen DCC-eCFP codiert war, hergestellt worden^[110]. Der Vektor war ein pVITRO2-mcs-Plasmid mit einem Hygromycin-B-Resistenzgen und zwei multiplen Klonierungsstellen (MCS1 und MCS2, siehe Anhang). Für die Kultivierung beider Zelllinien wird folgendes Medium benutzt (alle % sind Volumenprozent):

- DMEM
- 10 % FKS
- 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
- 2 mM Glutamax
- 2 mM nicht-essentielle Aminosäuren
- 20 µg/ml Gentamicin
- 500 µg/ml Geneticin (frisch zugeben)
- 150 µg/ml Hygromycin (frisch zugeben).

Die adhärente Kultivierung erfolgt entweder in Zellkulturflaschen (mit 25 oder 75 cm² Bodenfläche), oder auf Glasdeckgläschen (Ø 10 mm) in 24-*well*-Platten bei 37°C, 5 % CO₂

und 80 % Luftfeuchte in einem Inkubator. Für die Adhärenz der Zellen ist keine zusätzliche Beschichtung der Zellkulturgefäße notwendig. Alle zwei Tage wird ein vollständiger Mediumwechsel vorgenommen, wobei in die Flaschen mit 25 oder 75 cm² Bodenfläche je 3 bzw. 10 ml Medium pipettiert werden. Die Deckgläschenkulturen werden mit 500 µl Medium pro *well* kultiviert.

Spätestens bei Erreichen der Konfluenz wird geerntet oder passagiert. Letzteres betrifft nur die Flaschenkulturen. Für das Passagieren wird die Zellschicht vom Medium befreit, Accutase wird auf 37°C aufgewärmt und zugegeben (für Flaschen mit 25 cm² Bodenfläche 1 ml, für Flaschen mit 75 cm² Bodenfläche 3 ml). Die Flasche wird geschwenkt und dann die Hälfte der zugeführten Accutase wieder abgesaugt. Daraufhin wird 1,5 min bei 37°C inkubiert, und mikroskopisch kontrolliert, ob sich die Zellen von dem Flaschenboden lösen. Durch Zugabe von entsprechender Menge an frischem Medium (für Flaschen mit 25 cm² Bodenfläche 3 ml, für Flaschen mit 75 cm² Bodenfläche 5 ml) und spülen, wird die Reaktion abgestoppt und die abgelösten Zellen in Medium suspendiert. Im Anschluss erfolgt, wenn nötig, eine Bestimmung der Zellzahl mit dem *CASY*[®] *TTC*-Zellzählgerät und eine Neuaussaat der Zellen. Alternativ können die Zellen auch bei 200 × g für 5 min zentrifugiert und in Einfriermedium (Kulturmedium mit 5 % DMSO) aufgenommen und für spätere Anwendungen in flüssigem N₂ konserviert werden.

3.1.2 Ernte von eukaryotischen Zelllinien

Für weitere Versuche werden die Zellen in den Kulturflaschen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst und in PBS resuspendiert (für Flaschen mit 25 cm² Bodenfläche 3 ml, für Flaschen mit 75 cm² Bodenfläche 5 ml). Die Zellsuspension wird bei 200 × g für 5 min zentrifugiert und dann mit 3 ml PBS resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wird entweder bei -80°C eingefroren oder sofort weiter verwendet.

Die Ernte der Deckgläschenkulturen erfolgt durch Absaugen des Mediums aus den 24-*well*-Platten und anschließendes Waschen mit PBS. Nach Absaugen des PBS, werden die Zellen mit 4 %iger Formaldehydlösung (in PBS) für 30 min fixiert. Die Fixierlösung wird abgenommen und die Deckgläschen werden zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Zum Trocknen werden sie in eine neue 24-*well* Platte überführt, wobei vorher auf den Boden jedes *well*s ein Stück Whatman-Filterpapier gelegt wird. Nach 24-stündigem Trocknen wird die 24-*well*-Platte bei -20°C eingefroren. Verwendet werden die Zellen erst nach mindestens 24 h Lagerung bei -20°C.

3.1.3 Proteinexpressionsanalyse mittels Immundetektion

3.1.3.1 Western Blot

Zellaufschluss Durch Ultraschallaufschluss der Zellen wird das Gesamtprotein der Zellprobe freigesetzt. Dafür wird in 100-200 μl (je nach Zellmasse) RIPA-Puffer mit 1 % (v/v) Proteinase-Inhibitor dreimal für 15 s mit einer Amplitude von 30 % beschallt. Zwischendurch werden die Proben wegen der Wärmeentwicklung auf Eis gelagert. Dort werden sie auch bis zur Verwendung belassen, oder bei -20°C eingefroren.

Proteingehaltsbestimmung Die Proteinkonzentration wird nach Bradford^[111] bestimmt. Zum Eichen wird eine BSA-Konzentrationsreihe mit 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ BSA in PBS verwendet. Je 20 μl dieser BSA-Lösungen und der verdünnten Proteinproben (1:50 bis 1:500) werden in je ein *well* einer 96-*well*-Platte pipettiert. Sowohl für die Eichreihe, als auch für die Proben wird eine Doppelbestimmung vorgenommen. Die Zugabe von 180 μl 1:5 in Reinstwasser verdünntem *Roti-Nanoquant* (Bradford-Reagenz) zu jedem *well* erfolgt luftblasenfrei. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Taumler wird die Platte im *ELISA-Reader Sunrise* bei 620 nm ausgelesen und die Daten mit dem Computerprogramm *Magellan 3.11/V 6.5* ausgewertet. Mit Hilfe der Eichreihe werden die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet.

SDS-PAGE Die Proteinproben werden mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Als erstes wird ein 7,5 %iges Trenngel hergestellt. Der Ansatz für 10 ml Trenngel (reicht für ein 1,5 mm dickes Gel) ist folgender:

- 2,5 ml Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 %ig)
- 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,8)
- 4,79 ml Reinstwasser
- 100 μl SDS-Lösung (10 %ig)
- 100 μl APS-Lösung (10 %ig)
- 10 μl TEMED

Mit der Zugabe von APS und TEMED startet die Polymerisierung. Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten (in Apparatur befestigt) gegossen, so dass noch 1-2 cm Platz für das Sammelgel übrig bleiben. Das Trenngel wird mit 2-Propanol übergossen, um eine glatte Trennschicht zu erhalten. Nach ca. 45 min ist die Polymerisierung beendet und das 4 %ige Sammelgel wird vorbereitet (10 ml reichen für 2 Gele):

- 1,33 ml Acrylamid-Bisacrylamidlösung (30 %ig)
- 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 6,8)
- 5,96 ml Reinstwasser
- 100 µl SDS-Lösung (10 %ig)
- 100 µl APS-Lösung (10 %ig)
- 10 µl TEMED

Nach Zugabe von APS und TEMED wird die Sammelgellösung auf das zuvor mit Reinstwasser gespülte Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt, der im Gel Aussparungen (Taschen) für die Proben erzeugt. Nach 20-minütiger Polymerisation wird das feste Gel in die PAGE-Apparatur *Mini Protean III* von Bio-Rad eingebaut. Die Elektrophoresekammer wird mit Elektrodenpuffer befüllt, der Probenkamm wird entfernt und die Taschen werden mit Puffer gespült.

Vom Proteinextrakt werden 50 µg Protein mit 20 % (v/v) 5 × SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 50 °C denaturiert (im *Thermocycler*) und dann einzeln in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Neben den Proben werden auch 7 µl des *SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder* als Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Elektrophorese wird durch Anlegen von 100 V Gleichstrom gestartet. Erreicht die Lauffront (Bromphenolblau) das Trenngel wird die Spannung auf 150 V erhöht. Die Elektrophorese wird abgebrochen, wenn die blaue Lauffront das Ende des Gels erreicht hat.

Semi-Dry-Blot Das nach Molekulargewicht aufgetrennte Protein soll vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Dafür wird die Membran für 10 s in Methanol getaucht und anschließend mit Reinstwasser gewaschen und für mindestens 10 min im Transferpuffer äquilibriert. Ebenso werden zwei Whatman-Papiere im Transferpuffer eingeweicht. Membran und Whatman-Papiere haben dieselben Ausmaße wie das Gel.

Das Gel wird im Anschluss an die Elektrophorese aus den Glasplatten gelöst. Nach dem Entfernen des Sammelgels, wird das Trenngel für 5 min im Transferpuffer äquilibriert. Der *Blot* wird in der *Trans-Blot-Semi-Dry*-Kammer nach folgendem Schema aufgebaut: Auf die Anode (unten) wird ein Whatman-Papier gelegt, darauf die PVDF-Membran (glatte Seite nach oben), dann das Gel und zum Schluss noch ein Whatman-Papier. Die Kathode ist im Deckel der Kammer eingefasst. Wichtig ist, dass sich zwischen den Schichten (vor allem zwischen Membran und Gel) keine Luftblasen befinden. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgt bei 90 mA (ca. 1,5 mA/cm²) für 70 min. Der Erfolg des Proteintransfers wird durch eine Färbung des Proteins mit Ponceau-S überprüft. Hierfür wird die Membran 5 min auf einem

Taumler bei 40 Umdrehungen pro Minute (U/min) in der Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Nach Spülen mit Reinstwasser werden vorhandene Proteinbanden sichtbar. Die Färbung kann durch Waschen mit TBST wieder entfernt werden.

Immundetektion Der *Western Blot* mit den übertragenen Proteinen wird über Nacht bei 4 °C mit Blocklösung (5 % Magermilch) inkubiert (40 U/min), um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran ab zu sättigen. Am nächsten Tag wird die Blocklösung abgenommen und die Membran für 3 h mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert (40 U/min), wobei der polyklonale Ziege-anti-DCC-Antikörper in einer Konzentration von 0,1 µg/ml in TBST eingesetzt wird und der monoklonale Maus-anti-β-Aktin-Antikörper in einer Konzentration von 1,9 µg/ml. Nach diesem Inkubationsschritt wird die Membran dreimal je 10 min mit TBST gewaschen und dann folgt die einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (40 U/min). Für den anti-DCC-Antikörper ist dies ein F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper (markiert mit Meerrettichperoxidase), für den anti-β-Aktin-Antikörper ein F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper (ebenfalls markiert mit Peroxidase). Beide werden 1:5000 in TBST verdünnt eingesetzt. Nach diesem Inkubationsschritt wird erneut dreimal je 10 min mit TBST gewaschen. Für die Detektion des Komplexes aus Zielprotein, Primärantikörper und Sekundärantikörper wird die enzymatische Aktivität der Peroxidase genutzt. Bei Inkubation mit *Nowa*-Detektionslösung (2 Komponenten, 1:1 Mischung) katalysiert die Peroxidase eine Reaktion, bei der Chemilumineszenz auftritt. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt mit dem Geldokumentationssystem *ChemiDoc XRS* und dem Computerprogramm *Quantity One* 4.4.0. Um den Molekulargewichtsstandard sichtbar zu machen, wird zusätzlich ein Auflichtbild der Membran aufgenommen. Die Belichtungszeit beträgt für die Chemilumineszenzaufnahme 100 s und für die Aufnahme mit Auflicht 0,03 s.

Um verschiedene Proteine durch Immundetektion sichtbar zu machen, kann die Membran von gebundenen Antikörpern befreit werden. So wird sie nach der Detektion des einen Antigens (DCC) für 30 min in *Stripping*-Puffer gelegt (40 U/min), mehrmals in TBST gewaschen und dann zur Detektion eines weiteren Antigens (β-Aktin) erneut wie oben beschrieben behandelt.

3.1.3.2 Dot Blot

Der *Dot Blot* wird ähnlich dem *Western Blot* durchgeführt. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgt jedoch auf andere Art und Weise. Die Proteinlösung wird ohne vorherige Auftrennung durch SDS-PAGE direkt auf die mit Methanol benetzte und mit Reinstwasser und Transferpuffer behandelte Membran getropft. So werden von einer Tenascin-C-Konzentrationsreihe (1, 3, 10, 30, 100 µg/ml) jeweils 2 µl jeder Konzentration aufgetragen. Von der Konzentrationsreihe werden pro Experiment drei Replikate aufgetragen. Als Kontrolle werden 2 µl einer 100 µg/ml BSA-Lösung aufgetropft. Wenn die Tropfen angetrocknet sind,

wird die Membran mit Ponceau-S 5 min inkubiert (40 U/min), um das gebundene Protein nachzuweisen. Die Färbung wird durch Waschen mit TBST wieder entfernt. Anschließend wird 1 h mit 5 % Magermilch (w/v) geblockt und dann über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert (40 U/min). Für die Tenascin C-Detektion wird der Maus-anti-Tenascin-C-Antikörper von Millipore in einer Konzentration von 2 µg/ml in TBST eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Als Sekundärantikörper wird ein F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet, an den Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Der Antikörper wird in einer Konzentration von 0,14 µg/ml in TBST verwendet. Die Membran wird für 2 h mit der Sekundärantikörperlösung inkubiert und danach dreimal für 10 min in TBST gewaschen (40 U/min). Die Detektion der gebundenen Antikörper und somit des Antigens erfolgt wie beim *Western Blot* mit dem Geldokumentationssystem *ChemiDoc XRS* und dem Computerprogramm *Quantity One* 4.4.0. Die Belichtungszeit beträgt für die Chemilumineszenzaufnahme 150 s. Die lumineszierenden Flecken in den Aufnahmen werden semi-quantitativ mittels *ImageJ* hinsichtlich ihrer mittleren Grauwerte ausgewertet. Dafür wird das aufgenommene Bild in ein Graustufenbild umgewandelt, der Hintergrund wird abgezogen, das Bild wird invertiert und die mittleren Grauwerte der Flecken werden gemessen.

3.1.3.3 Immunzytochemie

Die bei -20 °C eingefrorenen Deckgläschen mit den HEK293- und HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen werden auf einer Heizplatte 15 min aufgetaut und getrocknet. In einer Färbekammer, deren Boden mit Wasser befeuchtet ist, werden sie anschließend auf ein mit Parafilm bespanntes Whatman-Papier gelegt. Sie werden für 45 min mit 50 µl Blocklösung (3 % w/v BSA in PBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen ab zu sättigen. Danach wird 3 h mit je 25 µl der Primärantikörperverdünnung in PBST inkubiert. Verwendet wird hierzu der Ziege-anti-DCC-Antikörper von Sigma-Aldrich in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBST. Nach den 3 h Inkubation mit dem Primärantikörper werden die Deckgläschen dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen und 1 h mit je 25 µl Zweitantikörperverdünnung in PBST inkubiert. Als Zweitantikörper werden F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy2 markiert sind (Anregungsmaximum 489 nm, Emissionsmaximum 503 nm). Die eingesetzte Konzentration beträgt 7,5 µg/ml in PBST. Aufgrund der Lichtsensitivität des Fluoreszenzfarbstoffs wird von hier an unter Lichtausschluss gearbeitet. Die Deckgläschen werden nach der Zweitantikörperinkubation dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgt die Zellkernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), das in Verbindung mit Doppelstrang-DNA ein Anregungsmaximum von 358 nm und ein Emissionsmaximum bei 461 nm besitzt. Dafür werden auf jedes Deckgläschen 25 µl einer DAPI-Verdünnung (1 µg/ml in PBS) pipettiert, für 45 s inkubiert und im Anschluss

zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Um Salzreste zu entfernen, wird mit Reinstwasser gewaschen. Nach dem Trocknen auf der Heizplatte werden die Deckgläschen zur Konservierung mit Kaisers Glyzeringelatine (bei 42 °C verflüssigt) auf einem Objektträger eingedeckelt. Es wird eine Färbekontrolle mitgeführt, bei der kein Erstantikörper zugegeben wird, sondern nur PBST. Die immunzytochemischen Färbungen der Deckgläschenkulturen werden dann mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop dokumentiert. Mit der Färbekontrolle wird die Laserleistung eingestellt, um die Hintergrundfärbung zu reduzieren.

3.2 Herstellung des 9WPtE-Elektrodenarraychips

Die Herstellung der 9WPtE-Elektrodenarraychips wird in einem Reinraum der ISO-Klasse 7 durchgeführt (nach ISO 14644-1), wobei im Bereich der Nasschemiebänke die ISO-Klasse 5 erreicht wird. Außerhalb des Reinraums werden auf die 9WPtE-Chips anschließend Messkammern aufgebracht und Referenzelektroden integriert.

3.2.1 Fertigungsschritte im Reinraum

Zur Fertigung der 9WPtE-Elektrodenarraychips wird das *Lift-off*-Verfahren angewandt (Abb. 12). Für diesen Zweck werden drei mittels AutoCAD entworfene Photomasken verwendet. Sie dienen der Übertragung der Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktpads des entworfenen 9WPtE-Elektrodenarrays auf die Borosilikatsubstrate ($49 \times 49 \times 1 \text{ mm}^3$) (Abb. 9).

Schritt 1: Säubern des Substrats Zu Beginn wird das Substrat gereinigt. Dafür wird es für jeweils 2 min in Reinstwasser, Aceton, 2-Propanol und abermals Reinstwasser im Ultraschallbad gewaschen. Danach wird das Substrat für 2 min in Piranha-Lösung getaucht, um organische Reste zu entfernen. Nach den 2 min wird es mit Reinstwasser grob abgespült und dann in einer Reinstwasserkaskade für 2 min gewaschen (zwei Becken, je 1 min pro Becken).

Schritt 2: Trocknen des Substrats Das Substrat muss vor dem nächsten Schritt vollständig getrocknet werden. Daher wird es zuerst durch Schleudern getrocknet. Es wird in einem Rotationsbeschichter auf eine Halterung (*Chuck*) positioniert und während des Schleuderns mittels Vakuum fixiert (Abb. 8A). Das Programm des Rotationsbeschichters wird wie folgt gewählt (U/min sind Umdrehungen pro Minute):

- 10 s 2000 U/min
- 10 s 3000 U/min
- 10 s 4000 U/min

- 20 s 6000 U/min

Auf das Trockenschleudern folgen 5 min auf der Heizplatte bei 95 °C.

Schritt 3: Belacken des Substrats Nachdem das Substrat wieder Raumtemperatur erlangt hat, wird es erneut auf dem *Chuck* des Rotationsbeschichters positioniert, um es zu Belacken (Abb. 8B). Aufgetragen wird 1 ml des Photolacks AR-P 3510, was ein Positivlack ist. Damit sich der Lack gleichmäßig auf dem Substrat verteilt (Schichtdicke ca. 3 µm), wird mit folgendem Programm geschleudert:

- 10 s 1000 U/min
- 60 s 2000 U/min
- 1000er Rampe.

Das Substrat wird mit der Vakuumpinzette entnommen, um die Lackschicht nicht zu beschädigen. Zum Aushärten des Lacks wird es 1 min bei 95 °C auf einer Heizplatte gebacken, wobei das Lösungsmittel austreibt ((Abb. 8A)). Das belackte, abgekühlte Substrat ist nun bereit zum Belichten.

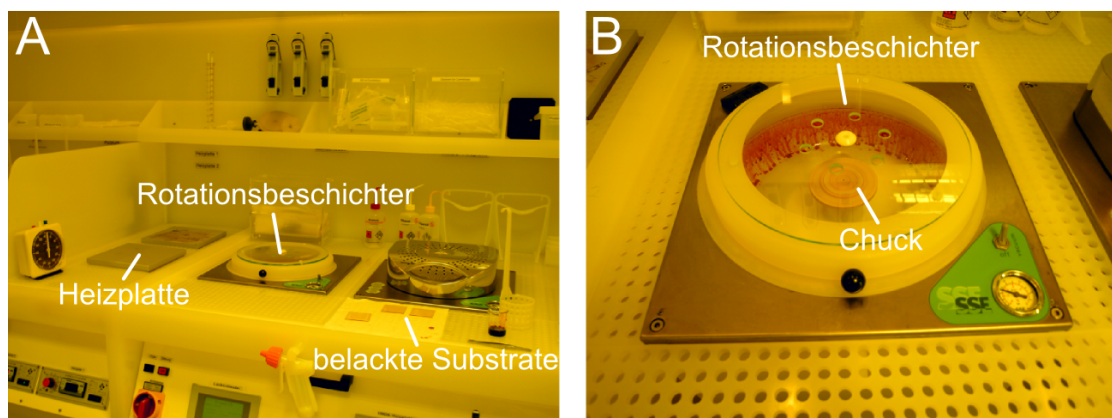


Abbildung 8: Rotationsbeschichter und Heizplatte zum Trocknen und Belacken der Substrate. **A:** Auf dem Rotationsbeschichter werden die Substrate trocken geschleudert und anschließend auf der Heizplatte bei 95 °C für 5 min gebacken. **B:** Das gleichmäßige Belacken erfolgt ebenfalls auf dem Rotationsbeschichter, wobei das Substrat durch Vakuum auf dem Substrathalterung (*Chuck*) fixiert wird. Der Lack auf den Substraten wird für 1 min auf der Heizplatte bei 95 °C ausgehärtet und dann werden die Substrate auf Raumtemperatur abgekühlt (**A**).

Schritt 4: Belichtungsvorgang (Randbelichtung) Zuerst soll der Rand des Substrats vom Lack befreit werden, da dieser an der Stelle eine Wulst bildet, die für die weiteren Belichtungsschritte stört. Für die Randbelichtung wird das Substrat unter einer Chrommaske (Maske 1,

Abb. 9A) im Belichter positioniert (Abb. 10). Positivlack hat die Eigenschaft nach der Verfestigung wieder löslich zu werden, wenn er mit UV-Licht in Kontakt kommt. Daher ist die Maske genau an der Stelle lichtdurchlässig, wo sich unter ihr der Rand des Substrats befindet. Nach dem Ausrichten des Substrats gegen die Maske wird belichtet. Hierzu werden Substrat und Maske in Kontakt gebracht (10 s Hartkontakt) und für 13 s mit UV-Licht einer Wellenlänge von 320–450 nm belichtet.

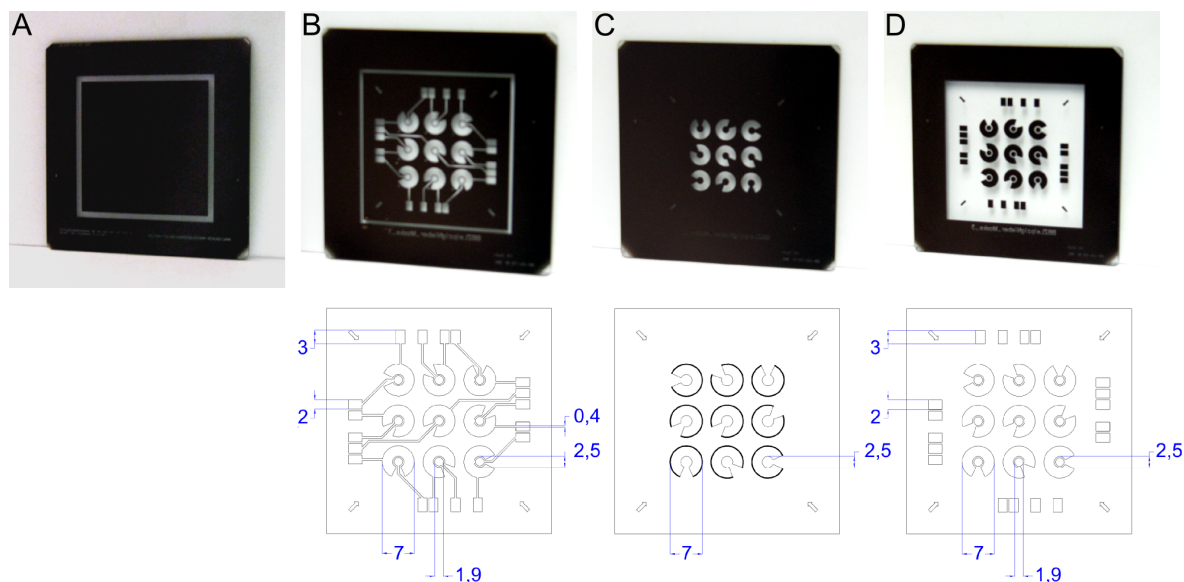


Abbildung 9: Masken für die photolithographische Strukturierung. Die mit AutoCAD entwickelten Masken dienen dem photolithographischen Aufbringen der Strukturen des 9WPtE-Arrays auf das Borosilikatsubstrat. Die Maske **A** ist die Randbelichtungsmaske und wird im Schritt 4 eingesetzt. Sie dient dem Entfernen einer Lackwulst am Rand des Substrats, welche die weiteren Belichtungsschritte stören würde. Die Maske **B** ist die erste Strukturierungsmaske zum Aufbringen der Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktpads. Sie wird im Schritt 7 eingesetzt. Maske **C** ist die zweite Strukturierungsmaske, die im Schritt 14 eingesetzt wird. Durch sie wird nur der Lack auf den Gegenelektroden belichtet, um diese mit Platin zu beschichten. Maske **D** ist die Passivierungsmaske, die im Schritt 22a eingesetzt wird. Sie dient der Passivierung der Leiterbahnen des 9WPtE-Chips mit SU8-Lack. Unter den Abbildungen der Masken **B**, **C** und **D** sind die entsprechenden AutoCAD-Zeichnungen mit den Maßen in mm eingefügt.

Schritt 5: Entwicklungsvorgang (nach Randbelichtung) Nach dem Belichten wird das Substrat für 30 s bei 95 °C gebacken und sofort in eine Entwicklerlösung (AR 300-35) getaucht und geschwenkt. Nach 60 s im Entwicklerbad wird die Entwicklung durch das Überführen in eine Reinstwasserkaskade abgestoppt (2 Becken, je 1 min).

Schritt 6: Trocknen des Substrats Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 7: Belichtungsvorgang (Strukturbelichtung) In den Lack auf dem Substrat werden in einem weiteren Belichtungsschritt die Elektrodenarraystrukturen eingefügt. Dazu wird eine Maske verwendet, die an den Stellen lichtdurchlässig ist, wo später die Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktpads des Arrays liegen sollen (Maske 2, Abb. 9B). Außerdem hat die Maske einen lichtdurchlässigen Rahmen, der genau auf den Rand des Substrats passt. Dadurch kann das Substrat an der Maske ausgerichtet werden. Auf der Maske befinden sich auch in allen vier Ecken lichtdurchlässige Pfeile, die ebenfalls auf das Substrat übertragen werden, was für die Ausrichtung von Substrat und Maske in einem späteren Belichtungsschritt (Schritt 14) wichtig ist. Belichtet wird wie unter Schritt 4 mit UV-Licht, allerdings nur für 9 s.

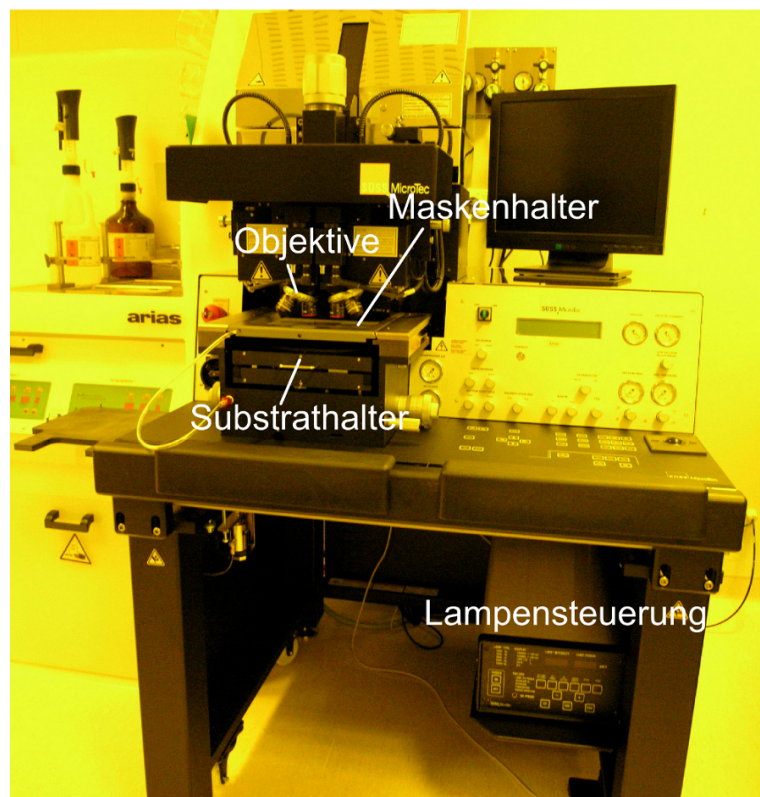


Abbildung 10: Belichter MA6. Im Belichter wird der lichtsensitive Photolack mit UV-Licht bestrahlt. Um die Strukturen des 9WPtE-Elektrodenarrays in den Lack zu übertragen, werden Masken verwendet, die für das Licht nur an den gewünschten Stellen durchlässig sind. Der Substrathalter mit dem Substrat wird gegen den Maskenhalter, in dem die Maske fixiert ist, ausgerichtet. Zur genauen Positionierung werden Vergrößerungsobjektive am Belichter genutzt, wobei das Bild auch auf einen PC übertragen werden kann. Nach der Positionierung wird der Kontakt zwischen Substrat und Maske hergestellt und mit UV-Strahlung einer Wellenlänge von 320–450 nm belichtet.

Schritt 8: Entwicklungsvorgang (nach Strukturbelichtung) Das Entwickeln nach Strukturbelichtung wird, wie unter Schritt 5 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 9: Trocknen des Substrats Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 10: Sputtern (Kathodenzerstäubung) des Haftvermittlers und der Goldschicht

Nachdem das Substrat abgekühlt ist, sollen nun Metallschichten aufgetragen werden. Dies erfolgt durch das sogenannte Sputtern (Kathodenzerstäubung). Das Substrat wird am Deckel der Vakuumkammer der Sputteranlage befestigt (Abb. 11A). Aufgrund der Größe der Sputterkammer, können maximal vier Chips in einem Durchgang (Charge) beschichtet werden. In den Sputterkopf wird das aufzubringende Material (zuerst Haftvermittler Indiumzinnoxid oder Chrom), das sogenannte *Target*, in Form einer Scheibe eingebaut. *Target* und Substrat liegen sich somit gegenüber (Abb. 11B). Die Kammer wird bis zu einem Druck von $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar oder niedriger evakuiert. Ist der Druck erreicht wird über ein Ventil Argon bis zu einem Druck von $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen. Das Gerät wird gestartet, das Plasma gezündet und der Prozessdruck durch Regulierung des Argonventils auf $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar eingestellt. Beim Gleichstromsputtern (DC-Sputtern) wird eine Leistung von 40 W eingestellt und für das Wechselstromsputtern (HF-Sputtern) 80 W. Bei beiden Betriebsarten wird zusätzlich durch Magnete im Sputterkopf ein Dauermagnetfeld aufgebaut, das das elektrische Feld überlagert (Magnetronsputtern). Dies bewirkt eine Erhöhung der Abscheiderate auf dem Substrat.

Als erstes wird eine Haftvermittlerschicht aus Indiumzinnoxid (ITO) oder Chrom (Cr) aufgetragen. Bei Cr ist zu beachten, dass es an Luft oxidiert. Daher muss das Substrat durch eine Blende vom Plasma, dass beim Starten des Sputtervorgangs gebildet wird, für mindestens 2 min abgeschirmt werden. Erst dann ist die Oxidschicht abgetragen, die Blende kann zur Seite geschoben und reines Cr auf dem Substrat abgeschieden werden. Von beiden Haftvermittlern, ITO und Cr, wird eine ca. 50 nm dicke Schicht aufgebaut. Kontrolliert wird die Schichtdicke durch eine im Plasmastrom befindliche Quarzkristallmikrowaage (Abb. 11B).

Auf die Haftvermittlerschicht wird im Anschluss Gold (Au) durch einen weiteren Sputterschritt aufgetragen. Dazu wird die Vakuumkammer geöffnet, ein Au-*Target* eingebaut, die Kammer erneut bis $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar evakuiert, Argon bis $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen, das Plasma gezündet und bei $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar Prozessdruck ca. 500 nm Au auf das Substrat abgeschieden. Im Fall von DC-Sputtern wird wiederum eine Leistung von 40 W eingestellt und bei HF-Sputtern 80 W.

Schritt 11: Lösen des verbliebenen Lacks (*Strippen*) Nach dem Sputtervorgang wird das Substrat aus der Kammer entnommen und in Aceton gelegt. Aceton löst den noch vorhandenen Lack und die darüber befindliche Metallschicht vom Substrat. Dadurch bleiben nur die

Metallstrukturen erhalten, die auf einer durch Belichten und Entwickeln vom Lack befreiten Region des Substrats abgeschieden wurden. Die Strukturen der Photomaske, die durchscheinend waren, sind nun als Metallschicht auf dem Substrat wiedergegeben. Das Substrat wird nach dem *Strippen* in 2-Propanol und Reinstwasser gewaschen.

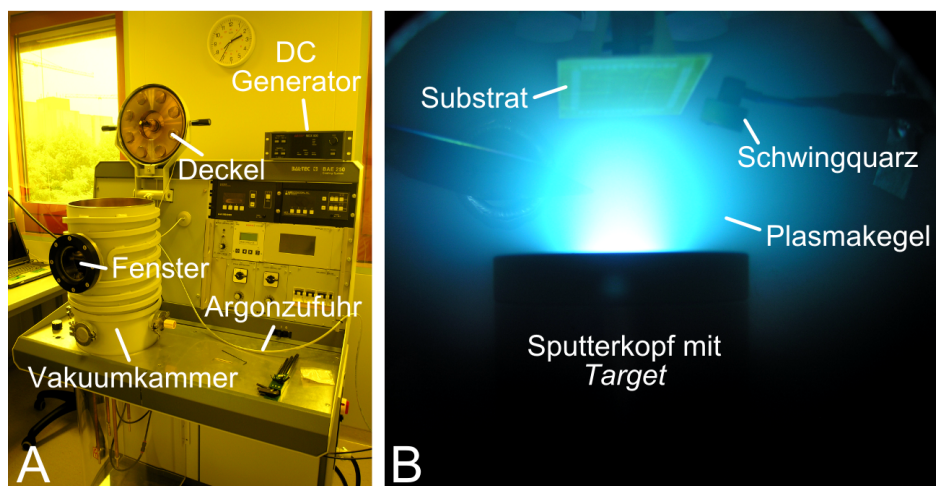


Abbildung 11: Sputteranlage zum Aufbringen der Metallschichten auf das Substrat. A: Das Substrat wird am Deckel der Sputteranlage befestigt (Substrathalter) und das *Target* im Sputterkopf. Die Vakuummkammer wird geschlossen und evakuiert. Dann wird Argon eingeleitet und mit dem DC-Generator (extern) oder dem HF-Generator das Plasma gezündet. **B:** Beim Blick durch das Fenster in der Vakuummkammer zeigt sich der Plasmakegel zwischen Sputterkopf mit *Target* und dem Substrat. Die auf das Substrat aufgetragene Schichtdicke wird durch eine Quarzkristallmikrowaage (mit Schwingquarz) im Plasmakegel verfolgt.

Schritt 12: Trocknen des Substrats Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 13: Belacken des Substrats Durch die vorangegangenen Schritte sind Strukturen wie Arbeits- und Gegenelektroden, Leiterbahnen und Kontaktpads auf das Substrat aufgebracht worden. Auf die Gegenelektroden wird im folgenden zusätzlich zur ITO- und Au-Schicht noch eine Schicht Platin (Pt) aufgetragen. Dazu wird das getrocknete Substrat erneut wie unter Schritt 3 beschrieben mit einer ca. 3 μm dicken Schicht des Positivlacks AR-P 3510 bedeckt.

Schritt 14: Belichtungsvorgang (Belichtung der Gegenelektroden) Die Strukturen der Gegenelektroden werden wieder vom Lack befreit. Dazu wird eine Maske verwendet, die an den Stellen lichtdurchlässig ist, wo sich die Gegenelektroden befinden (Maske 3, Abb. 9C). Außerdem sind auf der Maske in allen vier Ecken lichtdurchlässige Pfeile eingefügt. Auf dem

Substrat befinden sich an den gleichen Positionen ebensolche Pfeile, wodurch das Substrat an der Maske ausgerichtet werden kann. Belichtet wird wie unter Schritt 4 mit UV-Licht, allerdings nur für 9 s.

Schritt 15: Entwicklungsvorgang (nach Belichtung der Gegenelektroden) Das Entwickeln nach der Belichtung der Gegenelektroden wird, wie unter Schritt 5 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 16: Trocknen des Substrats Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 17: Sputtern (Kathodenzerstäubung) der Platinschicht Nachdem das Substrat abgekühlt ist, wird es am Deckel der Vakuumkammer der Sputteranlage befestigt (auf Substrathalter). In den Sputterkopf wird das Pt-*Target* eingebaut. Die Kammer wird bis zu einem Druck von $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar evakuiert, Argon bis $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen, das Plasma gezündet und bei einem Prozessdruck von $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar eine 50 nm dicke Platinschicht auf das Substrat aufgetragen. Kontrolliert wird die Schichtdicke wieder durch die Quarzkristallmikrowaage. Beim DC-Sputtern wird eine Leistung von 40 W eingestellt und für das HF-Sputtern 80 W.

Schritt 18: Lösen des verbliebenen Lacks (*Strippen*) Das *Strippen* wird, wie unter Schritt 11 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 19: Trocknen des Substrats Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

Schritt 20: Schichtdickenmessung Für die Messung der Schichtdicke der aufgetragenen Metalle werden von allen Arbeitselektroden und einer Gegenelektrode Aufnahmen mit dem Mikroskop *FRT MicroSpy*[®] *Topo* und dem Programm *FRT Aquire (Inspector)* angefertigt. Mit dem Programm *FRT Mark III* werden im Anschluss Profile der Elektrodenkanten (Übergang Elektrode zu Substrat) hinsichtlich der Höhenunterschiede ausgewertet. Daraus wird die Höhe der Elektroden, also ihre Schichtdicke ermittelt.

Nach der Schichtdickenmessung wird entweder noch eine Passivierungsschicht aus SU8-Lack aufgetragen (Schritte 21a, 22a, 23a, 24a), oder die Elektrodenarraychips werden ohne Passivierung belassen und mit Piranha-Lösung abschließend gereinigt (Schritte 21b, 22b).

Schritt 21a: Belacken mit SU8 Das Substrat wird auf dem *Chuck* des Rotationsbeschichters positioniert, um es zu Belacken. Aufgetragen werden 2 ml des Photolacks SU8 (SU8 2),

was ein Negativlack ist. Der Lack wird 1 min ruhend auf dem Chip belassen. Dann wird mit folgendem Programm geschleudert (Schichtdicke ca. 1,5 μm):

- 10 s 500 U/min
- Rampe 100 U/s
- 60 s 3000 U/min
- Rampe 300 U/s

Das Substrat wird mit der Vakuumpinzette entnommen, um die Lackschicht nicht zu beschädigen. Zum Aushärten des Lacks wird 1 min bei 65 °C (HMDS-Heizplatte) gebacken und danach 1 min bei 95 °C. Das belackte, abgekühlte Substrat ist nun bereit zum Belichten.

Schritt 22a: Belichtungsvorgang für Passivierung mit SU8 Der SU8-Lack soll die Leiterbahnen abschirmen, aber die Elektroden und Kontaktpads sollen offen liegen. Da SU8 ein Negativlack ist, härtet er durch UV-Belichtung aus. Also wird eine Maske verwendet, bei der die Stellen lichtdurchlässig sind, wo sich später Lack befinden soll (Maske 3, Abb. 9C). Das Substrat wird wieder durch die Pfeile in den Ecken an der Maske ausgerichtet. Belichtet wird wie unter Schritt 4 mit UV-Licht, allerdings für 20 s.

Schritt 23a: Entwicklungsvorgang nach Belichtung von SU8 Nach dem Belichten wird das Substrat für 1 min bei 65 °C und danach für 1 min bei 95 °C gebacken. In der Entwicklerlösung (*mr-Dev 600*) verbleibt es 60 s. Die Entwicklung wird durch das Überführen in 2-Propanol abgestoppt. Danach wird in Reinstwasser gewaschen.

Schritt 24a: Trocknen des Substrats nach SU8-Beschichtung Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen. Es wird allerdings nur für 2 min auf der Heizplatte gebacken.

Schritt 21b: Abschließende Reinigung für Chips ohne SU8 Das Substrat wird für 1 min in Piranha-Lösung getaucht, um Lackreste zu entfernen. Danach wird es mit Reinstwasser grob abgespült und dann in einer Reinstwasserkaskade für 2 min gewaschen (zwei Becken, je 1 min pro Becken).

Schritt 22b: Trocknen des Substrats für Chips ohne SU8 Das Substrattrocknen wird, wie unter Schritt 2 beschrieben, vorgenommen.

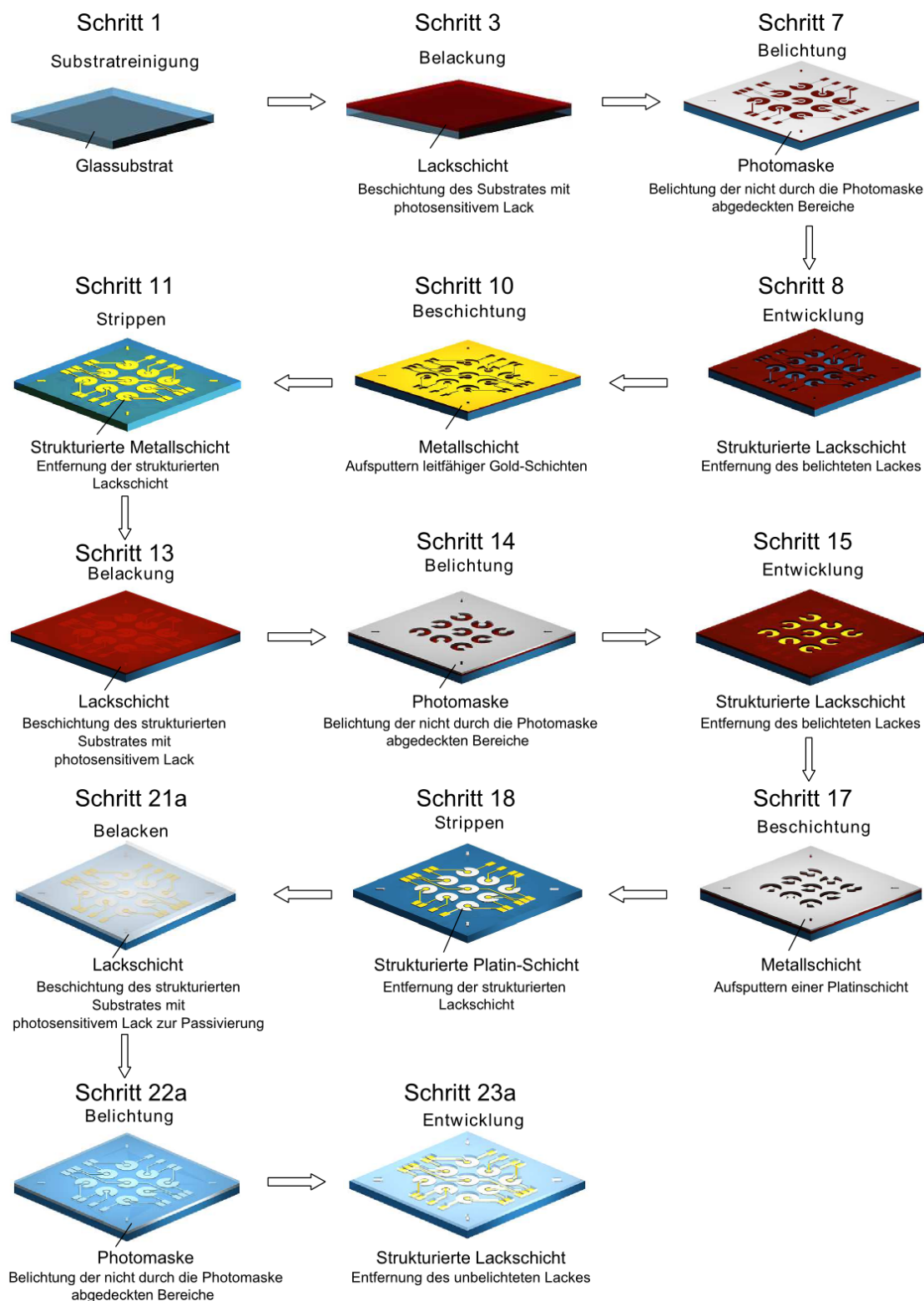


Abbildung 12: Schema der Fertigungsschritte für den 9WPtE-Elektrodenarraychip im Reinraum. Die Schritte 21a, 22a, 23a werden nur für die Elektrodenarrays durchgeführt, die eine Passivierung mit SU8-Lack erhalten sollen. Für die anderen Arrays wird stattdessen eine abschließende Reinigung und Trocknung vorgenommen (siehe Text Schritt 21b, 22b). Nicht dargestellt ist die Randbelichtung mit anschließender Entwicklung und Substrattrocknung (Schritte 4, 5, 6).

3.2.2 Integration von Messkammern und Referenzelektroden

Um die neun Elektrodenpaare des 9WPtE-Elektrodenarraychips separat nutzen zu können, werden abgeschlossene Reaktionsräume geschaffen. Dafür wird mit Hilfe einer Bandsäge ein 3-x-3-*well*-Stück aus einer 96-*well*-Platte ausgeschnitten und der Boden der *wells* abgetrennt. Die Kammern werden mit Silikon (*Loctite 5366*) auf den Elektrodenarraychip geklebt, der dafür im 96-*well*-Maßstab gehalten ist. Der Silikonkleber wird für 24 h getrocknet.

Zusätzlich zu Arbeits- und Gegenelektroden wird in jede Messkammer eine Referenzelektrode integriert. Dazu wird ein auf das 3-x-3-*well*-Stück passender Deckel aus PMMA (Polymethylmethacrylat) gefräst. In den Deckel werden Löcher gebort, so dass sich je ein Loch mittig über jeder Kammer befindet. In jedes Loch wird mit Silikon eine Steckerbuchse geklebt. An die Buchse wird ein ca. 0,7 cm langer Silberdraht (\varnothing 0,5 mm) gelötet. Auf dem Silberdraht wird durch Galvanisierung AgCl abgeschieden. Dafür wird der Draht in Aceton und Reinstwasser gewaschen und für 10 s in eine 10 %ige Salpetersäurelösung (w/v) getaucht und danach erneut mit Reinstwasser gewaschen. Dann werden die Silberdrähte in 0,5 M KCl-Lösung (in Reinstwasser) getaucht. Außerdem wird ein Platindraht ebenfalls in diese Lösung getaucht. Zwischen den Silberdrähten und dem Platindraht wird für mindestens 15 min eine Gleichspannung von 1,3 V angelegt, wobei der Platindraht negativ und die Silberdrähte positiv gepolt sind. Dadurch werden negative Chloridionen zur Silberelektrode getrieben und reagierten dort mit Silber zu dem wasserunlöslichen Salz AgCl, welches sich auf den Silberdrähten abscheidet. Die so hergestellten Silber/Silberchloridelektroden (Ag/AgCl) werden ohne weitere Abschirmung als Referenzelektroden eingesetzt.

3.3 Herstellung des Sensorobjektträgers

Die Fertigung des Sensorobjektträgers wird ebenfalls im Reinraum durchgeführt. Außerhalb des Reinraums werden die Elektroden kontaktiert, eine Durchflussskammer aufgebracht und eine Referenzelektrode integriert.

3.3.1 Fertigungsschritte im Reinraum

Das Design des Sensorobjektträgers sieht zwei streifenförmige Elektroden auf einem Standardobjektträger vor. Die kleinere Elektrode mit einer Breite von 3 mm soll als Arbeitselektrode dienen und eine Goldoberfläche haben und die größere Elektrode mit einer Breite von 50 mm als Gegenelektrode mit Platinoberfläche. Die Fertigung der Elektroden lehnt sich an die Fertigung des 9WPtE-Elektrodenarraychips an.

Schritt 1: Säubern der Objektträger Zu Beginn werden die Objektträger gereinigt. Dafür werde sie für jeweils 2 min in Reinstwasser, Aceton, 2-Propanol und abermals Reinstwasser

im Ultraschallbad gewaschen. Danach werden die Objektträger für 2 min in Piranha-Lösung getaucht, um organische Reste zu entfernen. Nach den 2 min werden sie mit Reinstwasser grob abgespült und dann in einer Reinstwasserkaskade für 2 min gewaschen (zwei Becken, je 1 min pro Becken).

Schritt 2: Trocknen der Objektträger Die Objektträger müssen vor dem nächsten Schritt vollständig getrocknet werden. Daher werden sie zuerst mit dem Rotationsbeschichter getrocknet. Sie werden auf dem *Chuck* positioniert und während des Schleuderns mittels Vakuum fixiert. Das Programm des Rotationsbeschichters wird wie folgt gewählt:

- 10 s 2000 U/min
- 10 s 3000 U/min
- 10 s 4000 U/min
- 20 s 6000 U/min.

Auf das Trockenschleudern folgen 5 min auf der Heizplatte bei 95 °C.

Schritt 3: Sputtern (Kathodenzerstäubung) des Haftvermittlers und der Gold- und Platinschicht Wenn die Objektträger abgekühlt sind, sollen die Metallschichten aufgetragen werden. Dies erfolgt durch Sputtern (Kathodenzerstäubung). Um streifenförmige Elektroden zu erreichen, werden maximal drei Objektträger in eine Plastikmaske gelegt, die an den Stellen Aussparungen hat, wo sich Metall abscheiden soll (Abb. 13). Die Maske mit den Objektträgern wird am Deckel der Vakuumkammer der Sputteranlage befestigt. In den Sputterkopf wird das *Target* (zuerst Haftvermittler Indiumzinnoxid) eingebaut. *Target* und Objektträger liegen sich gegenüber. Die Kammer wird bis zu einem Druck von $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar oder niedriger evakuiert. Ist der Druck erreicht wird über ein Ventil Argon bis zu einem Druck von $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen. Das Gerät wird gestartet, das Plasma gezündet und der Prozessdruck durch Regulierung des Argonventils auf $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar eingestellt. Es wird im Wechselstrom gesputtert (HF-Sputtern) bei einer Leistung von 80 W. Als erstes wird eine 50 nm dicke Haftvermittlerschicht aus Indiumzinnoxid (ITO) aufgetragen. Kontrolliert wird die Schichtdicke durch eine im Plasmastrom befindliche Quarzkristallmikrowaage. Danach wird auf die Haftvermittlerschicht eine 500 nm dicke Goldschicht durch einen weiteren Sputterschritt aufgetragen. Dazu wird die Vakuumkammer geöffnet, das ITO- gegen ein Au-*Target* ausgetauscht, die Kammer erneut bis $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar evakuiert, Argon bis $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen, das Plasma gezündet und bei $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar Prozessdruck Au auf die Objektträger abgeschieden (HF-Sputtern, 80 W).

Um auf den Gegenelektroden eine Platinoberfläche zu realisieren, wird die Vakuumkammer erneut geöffnet. Die Goldarbeitselektroden auf den Objektträgern werden durch einen Plastikstreifen abgeschirmt und nur die Gegenelektroden liegen frei. Das Au-*Target* wird gegen Pt ausgetauscht, die Kammer wird bis $8,6 \cdot 10^{-5}$ mbar evakuiert, Argon bis $1,2 \cdot 10^{-2}$ mbar eingelassen, das Plasma gezündet und bei einem Prozessdruck von $7,3 \cdot 10^{-3}$ mbar eine 50 nm dicke Platinschicht auf die Objektträger aufgetragen (HF-Sputtern, 80 W).

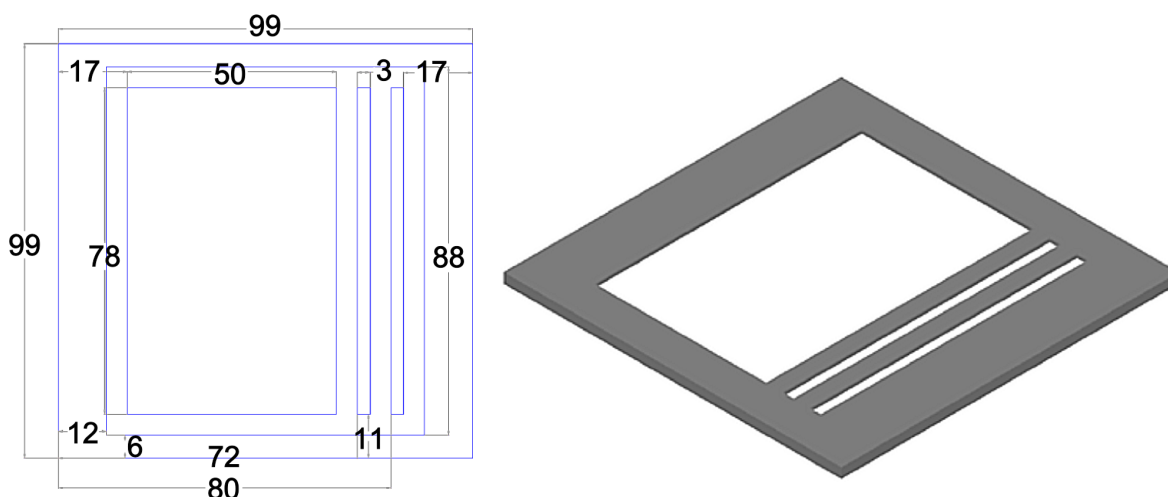


Abbildung 13: Sputtermaske zum Aufbringen von streifenförmigen Elektroden auf Objektträger. Das Design der Maske erlaubt das gleichzeitige Beschichten von drei Objektträgern (alle Maße im Bild in mm). Beim Sputtern entsteht auf allen drei Objektträgern jeweils eine große Elektrode (Gegenelektrode) mit einer Breite von 50 mm. Außerdem besteht die Möglichkeit zwei kleinere Elektroden (3 mm Breite) pro Objektträger aufzubringen. In dieser Arbeit wird jedoch nur die Elektrode nahe zur Gegenelektrode als Arbeitselektrode genutzt. Die andere Öffnung in der Maske wird während des Sputterns von Indiumzinnoxid und Gold abgedeckt. Genauso werden die Arbeitselektroden beim Platinsputtern abgedeckt, damit nur die Gegenelektroden eine Platinoberfläche erhalten.

Schritt 21: Abschließende Reinigung Die Objektträger werden für 30 s in Piranha-Lösung getaucht. Danach werden sie mit Reinstwasser grob abgespült und dann in einer Reinstwasserkaskade für 2 min gewaschen (zwei Becken, je 1 min pro Becken).

Schritt 22: Trocknen der Objektträger Die Objektträger werden, wie unter Schritt 2 beschrieben, getrocknet.

3.3.2 Kontaktierung der Elektroden und Integration einer Durchflussskammer und einer Referenzelektrode

Um die zwei Streifenelektroden auf den Objektträgern ans Messsystem anschließen zu können, wird an den Rand der Elektroden je ein Kabel mit Steckerbuchse durch Silberkleber befestigt. Der Silberkleber wird mindestens 4 h bei 65 °C ausgehärtet. Für Experimente im Durchfluss werden spezielle Durchflussskammern (*sticky-Slide I 0.2 Luer* von ibidi) aufgeklebt. Der Kleber ist sofort haftend und resistent gegen Lösungsmittel. Auch bei den Sensorobjektträgern wird eine Silber/Silberchloridelektrode (Ag/AgCl) als Referenz verwendet. Dazu wird ein ca. 0.7 cm langer Silberdraht (\varnothing 0,5 mm) in Aceton und Reinstwasser gewaschen und für 10 s in eine 10 %ige Salpetersäurelösung (w/v) getaucht und danach erneut mit Reinstwasser gewaschen. Dann wird der Silberdraht zusammen mit einem Platindraht in 0,5 M KCl-Lösung (in Reinstwasser) getaucht. Zwischen den Drähten wird für mindestens 15 min eine Gleichspannung von 1,3 V angelegt, wobei der Platindraht negativ und der Silberdraht positiv gepolt ist. Dabei scheidet sich wasserunlösliches AgCl auf dem Silberdraht ab (Galvanisierung). Die so hergestellte Ag/AgCl-Elektrode wird ohne weitere Abschirmung als Referenzelektrode eingesetzt. Sie wird, eingefasst in einen passenden Adapter, in die Durchflussskammern getaucht und über ein Klemmkabel mit dem Messgerät verbunden.

3.4 Bestimmung der Rauigkeit von Elektrodenoberflächen mittels Rasterkraftmikroskopie

Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen (AFM, *Atomic Force Microscopy*) werden mit einem *Bioscope Catalyst* von Bruker AXS durchgeführt. Die optische Kontrolle erfolgt mit einem Aufrichtmakroskop *Z16 APO* von Leica. Kontrolliert wird das AFM-Gerät durch eine *NanoScope V*-Reglereinheit mittels *NanoScope 8.1* Software. Als Operationsmodus wird der *ScanAsyst*-Aufnahmemodus mit automatisierter Optimierung der Aufnahmeparameter gewählt. *ScanAsyst* basiert auf dem *Peak-Force-Tapping*-Modus von Bruker AXS. Dabei wird eine Kraftkurve für jedes Pixel der Aufnahme aufgezeichnet. Die Spitzenkraft jeder Kurve wird dann als Rückkopplungssignal der Aufnahme verwendet. Ein Siliziumnitrid-Messfühler (*Cantilever*) mit einer nominalen Federkonstante von 0,4 N/m und einem Spitzenradius von 2 nm am Apex wird für die AFM-Aufnahmen in Luft verwendet (*ScanAsyst-Air*, Bruker AXS). Ausschnitte von 256×256 Pixel² werden mit einer Scanrate von 1 Hz abgetastet. Im Anschluss werden die Aufnahmen einer Rauigkeitsanalyse unterzogen. Bestimmt wird die mittlere Oberflächenrauigkeit r_a als das arithmetische Mittel der absoluten Werte der Oberflächenhöhenunterschiede gemessen von der mittleren Ebene. Vor der Bestimmung der Rauigkeit werden die Aufnahmen durch Glättung zweiter Ordnung und einen Tiefpassfilter der *NanoScope*-Analysesoftware bearbeitet.

3.5 Elektrochemische Messungen

3.5.1 Messlösung

Das charakterisieren der Elektroden des 9WPtE-Elektrodenarraychips und des Sensorobjektträgers und das Auslesen der auf ihnen basierenden Biosensoren erfolgt mittels elektrochemischen Messmethoden. Als Messlösung, welche den Kontakt zwischen der Arbeits- und der Gegenelektrode herstellt, wird eine wässrige Lösung von Kaliumhexacyanoferrat III und II (Ferri-/Ferrocyanid) verwendet. Beide Salze werden in einem 1:1 Verhältnis (äquimolar) eingesetzt und zusätzlich wird als Leitsalz Kaliumchlorid (KCl) zugesetzt. Die Konzentrationen der Redoxionen (Ferri-/Ferrocyanid) und des Leitsalzes variieren in den Experimenten und sind daher an den entsprechenden Stellen angegeben.

3.5.2 Messaufbau für den 9WPtE-Elektrodenarraychip

Auf dem 9WPtE-Chip sind die Arbeits- und Gegenelektroden über Leiterbahnen mit Kontaktpads verbunden, die dem kontaktieren der Elektroden dienen. Dazu wird der Chip in einen eigens dafür entwickelten Adapter gestellt (Eigenbau im Labor für Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik). Dieser Adapter verbindet die Kontaktpads (und somit die Elektroden) elektrisch mit dem *HiMUX32*-Multiplexer. Die elektrochemischen Messungen erfordern die Kontrolle des an den Arbeitselektroden anliegenden Potentials durch Referenzelektroden. Daher wird ein Deckel mit Ag/AgCl-Referenzelektroden (siehe 3.2.2) aufgesetzt. Die Referenzen stehen über die Messlösung im Kontakt zu den Arbeitselektroden. Sie werden direkt über Steckerbuchsen im Deckel und passende Kabel mit dem Multiplexer verbunden. Vom Multiplexer aus werden die Kanäle angesteuert. Jeder Kanal besteht aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode (Dreielektrodenkonfiguration). Der *HiMUX32* ist seinerseits mit dem Messgerät *Compact Stat* (Potentiostat und Impedanzanalysator) verbunden. Gesteuert wird die Messung durch das Programm *IviumSoft* 1.922 auf einem PC, an den der *Compact Stat* angeschlossen ist. Mit der Software werden Routinen geschrieben, die durch den Multiplexer eine automatische Ansteuerung der Elektroden des 9WPtE-Chips und somit automatische Messabläufe erlauben.

3.5.3 Messaufbau für den Sensorobjektträger

Arbeits- und Gegenelektrode des Sensorobjektträgers werden über mit Silberkleber befestigte Kabel direkt an das Messgerät *Compact Stat* (Potentiostat und Impedanzanalysator) angeschlossen. Die elektrochemischen Messungen erfordern auch hier die Kontrolle des an der Arbeitselektrode anliegenden Potentials durch eine Referenzelektrode. Daher wird für die Messungen ein Ag/AgCl-Draht in die Durchflussskammer getaucht. Über die Messlösung steht

die Referenz im Kontakt zur Arbeitselektrode und ist über ein Klemmkabel ebenfalls mit dem *Compact Stat* verbunden. Gesteuert wird die Messung durch das Programm *IviumSoft* 1.922 von einem PC, an den der *Compact Stat* angeschlossen ist. Die Ansteuerung und Messung erfolgt beim Sensorobjektträger manuell.

3.5.4 Zyklovoltammetrie

Für zykvoltammetrische Messungen wird an der Arbeitselektrode, bezogen auf die Referenzelektrode, Spannung angelegt und die entsprechende Stromstärke gemessen. Die Spannung wird dabei zyklisch zwischen zwei Extrema (Vertices) geändert. Die Vertices werden je nach Experiment anders gewählt und sind daher an entsprechender Stelle angegeben. Die Stufenhöhe, also die Spannung, um die sich die aktuelle Spannung in jedem Schritt ändert, wird mit 5 mV festgelegt. Als Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scanrate) wird, wenn nicht anders angegeben, 0,1 V/s gewählt.

3.5.4.1 Zyklovoltammetrische Charakterisierung der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid

Die zykvoltammetrischen Messungen dienen nicht nur der Reinigung der Elektroden (Kapitel 3.10), sondern auch der Qualitätsprüfung. Anhand der Kriterien in Tab. 2 kann auf die Art der Reaktion von Ferri-/Ferrocyanid und somit auf die Sauberkeit der Elektroden geschlossen werden. Zu den Kriterien zählen das Verhältnis der gemessenen Peakstromstärken $I_{p,a}/I_{p,k}$, die Peakseparation (ΔE_p) und die Abhängigkeit der Peakstromstärken und der Peakseparation von der Potentialvorschubgeschwindigkeit (ν , Scanrate).

3.5.5 Impedanzspektroskopie

Bei den impedimetrischen Messungen wird an der Arbeitselektrode, bezogen auf die Referenzelektrode, eine Gleichspannung angelegt, die dem offenen Zellpotential entspricht (offenes Zellpotential von Ferri-/Ferrocyanid gegen die Referenz). Die Gleichspannung wird von einer 10 mV (wenn nicht anders angegeben) Wechselspannung überlagert. Für ausgewählte Frequenzen von 1 Hz bis 100 kHz (logarithmische Abstände, 11 Frequenzen pro Dekade) wird die Wechselstromstärke gemessen, woraus sich die Impedanz, der Widerstand im Wechselstromkreis, ergibt.

Tabelle 2: Kriterien zur Bestimmung von einfachen Reaktionsmechanismen. Durch die aufgeführten fünf Kriterien (Verschiebung der Peakstromstärken I_p in Richtung des Potentialanstiegs bei Vergrößerung der Scanrate ν , ΔE_p , $I_p/\sqrt{\nu}$ und $I_{p,a}/I_{p,k}$) kann der Reaktionsmechanismus bestimmt werden. α ist der Durchtrittsfaktor aus der Butler-Volmer-Gleichung^[112] und hat einen Wert von 0,5, wenn Hin- und Rückreaktion symmetrisch verlaufen.^[77,78]

Mechanismus	Verschiebung von I_p Richtung Potentialanstieg bei Vergrößerung von ν	ΔE_p	$I_p/\sqrt{\nu}$	$I_{p,a}/I_{p,k}$
reversibel, ungehemmter Ladungsaustausch, Diffusionskontrolle	nein	59 mV/n	konstant	1
gehemmter Ladungsaustausch, Durchtrittskontrolle	ja	59 mV/n nimmt mit ν zu	konstant	1 (für $\alpha = 0,5$)
Ladungsaustausch nur für anodische bzw. kathodische Reaktion möglich, Durchtrittskontrolle	ja	kein Gegenpeak	konstant	-
ein umkehrbarer chemischer Schritt ist dem Ladungsaustausch nachgelagert	ja	-	wächst mit ν	1 für kleines ν , nimmt mit Steigerung von ν ab

3.5.5.1 Datenanalyse und -modellierung mittels Ersatzschaltbild

Die Impedanzspektren werden mit Hilfe von zwei elektrischen Ersatzschaltbildern numerisch analysiert. Die gewählten Ersatzschaltbilder lehnen sich an das Modell von Randles^[80] an (siehe Abb. 6A). Die Kapazität der Ionendoppelschicht an der Elektrode wird allerdings ersetzt durch ein empirisches konstantes Phasenelement (CPE). Das erste modifizierte Modell besteht also aus einer Reihenschaltung von Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) und Warburgimpedanz als dem elektrochemischen Element, dass die Diffusion widerspiegelt. In Parallelschaltung zu diesen beiden befindet sich ein CPE. Zu dem Komplex aus R_{ct} , Warburgimpedanz und CPE ist der Lösungsmittelwiderstand (R_s) in Reihe geschaltet. Das zweite verwendete Modell unterscheidet sich vom ersten Modell lediglich durch die Abwesenheit der Warburgimpedanz. Welches Modell für die Auswertung der Impedanzspektren verwendet wird, orientiert sich am

Bedeckungsgrad der Elektrode. Ist dieser hoch, so besteht keine Diffusionsabhängigkeit der Redoxreaktion und das Warburgelement wird weggelassen.

Die komplexe Impedanz Z setzt sich zusammen aus den Einzelimpedanzen der ohmschen Widerstände, des CPE und des Warburgelements, die wie folgt definiert sind:

- ohmscher Widerstand

$$Z_R = R \quad (10)$$

- CPE

$$Z_{\text{CPE}} = \frac{1}{A(j2\pi f)^n} \quad (11)$$

- Warburgelement

$$Z_W = \frac{\sigma}{\sqrt{2\pi f}}(1 - j) \quad (12)$$

wobei R der ohmsche Widerstand ist, f die Frequenz und A ein CPE-Parameter, der der Kapazität eines Kondensator entspricht, wenn n , ein weitere CPE-Parameter, 1 ist. σ ist der Warburgkoeffizient und j die imaginäre Einheit.

Für eine mathematische Gesamtbeschreibung der beiden Ersatzschaltbilder wurden die Einzelimpedanzen zusammengefasst. Dabei wurden die Regeln für die Zusammenfassung von Widerständen beachtet. Diese besagen, dass die Impedanz zweier Elemente in Reihe gleich der Summe ihrer Einzelimpedanzen ist und die reziproke Impedanz zweier parallel geschalteter Elemente ist die Summe der reziproken Einzelimpedanzen. Für das Ersatzschaltbild $((R_{\text{ct}} - Z_W)||\text{CPE}) - R_s$ ergibt sich dadurch

$$Z = \left(\frac{1}{Z_{R_{\text{ct}}} + Z_W} + \frac{1}{Z_{\text{CPE}}} \right)^{-1} + Z_{R_s} \quad (13)$$

und für das Ersatzschaltbild $(R_{\text{ct}}||\text{CPE}) - R_s$

$$Z = \left(\frac{1}{Z_{R_{\text{ct}}}} + \frac{1}{Z_{\text{CPE}}} \right)^{-1} + Z_{R_s} \quad (14)$$

Die experimentellen Daten werden mit diesen mathematischen Modellen angepasst. Dazu wird mit der Nelder-Mead-Methode, die in die *fminsearch*-Funktion von *MATLAB* (Version 7.0.1 R14) integriert ist, die Summe der Residuen des Impedanzbetrags und der Phasenverschiebung minimiert. Die *MATLAB*-Anpassungsroutinen wurden freundlicherweise von

Dr. Oliver Pänke (Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik) zur Verfügung gestellt und erlauben eine automatische sequentielle Verarbeitung der eingegebenen Daten. Die Anpassung hatte in keinem Fall einen Einfluss auf das Messergebnis, d. h. beobachtete signifikante Änderungen der berechneten Impedanzparameter beruhten nicht auf der Anpassungsroutine, sondern auf Änderungen des Messsystems.

3.6 Funktionalisierung der Goldarbeitselektroden

Zum Aufbau von verschiedenen Biosensoren sollen auf den Goldarbeitselektroden des 9WPtE-Elektrodenarraychips und des Sensorobjektträgers Proteine bzw. Antikörper immobilisiert werden. Für diese Immobilisierung wird die Chemoligation mittels Thiolchemie genutzt. Zuerst wird auf die Goldoberfläche der Elektroden eine sich selbst-organisierende Monoschicht aus Thiolen, ein sogenannter Thiol-SAM (*self-assembled monolayer*) immobilisiert. Danach wird der Thiol-SAM chemisch aktiviert. Die aktiven Gruppen der Thiole reagieren mit primären Aminen von Proteinen bzw. Antikörpern, wodurch diese kovalent an den Thiol-SAM gebunden werden.

3.6.1 Selbstorganisation von Thiolen auf den Goldarbeitselektroden

Als Thiole für den Aufbau von Monoschichten auf den Goldarbeitselektroden werden 11-Mercaptoundekansäure (MUDA), eine 1:9 Mischung (molar) aus MUDA und 6-Mercaptohexanol (MHO), 3-Mercaptopropionsäure (MPA) und Cysteamin verwendet. Das Thiol MUDA und die Thioldmischung aus MUDA und MHO werden in Ethanol gelöst eingesetzt. MPA wird sowohl in Ethanol als auch in Reinstwasser gelöst eingesetzt und Cysteamin nur in Reinstwasser. Als Konzentration wird für alle Thiole bzw. Thioldmischungen 1 mM gewählt. Die sauberen Elektroden der 9WPtE-Chips werden für 18 h mit der jeweiligen Thioldlösung unter Luftabschluss ruhend inkubiert, die Elektroden der Sensorobjektträger lediglich für 3 h. Nach der Inkubation werden die Elektroden zweimal mit Ethanol und zweimal mit Reinstwasser gewaschen und dann entweder für die jeweiligen Experimente verwendet oder in PBS bei 4 °C gelagert.

3.6.2 Kovalente Bindung von Proteinen und Antikörpern an MUDA-SAMs

Auf den mit MUDA-SAMs beschichteten Elektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips oder der Sensorobjektträger werden zum Aufbau von Biosensoren Proteine oder Antikörper immobilisiert. Dazu wird die Carboxylgruppe der Thiole aktiviert. Für 10 min wird eine wässrige Lösung von 200 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und 50 mM N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS) auf die Thiol-beschichtete Arbeitselektrode aufgetragen (2 µl).

Die Carboxylgruppen reagieren mit EDC und NHS letztlich zu NHS-Estern, die mit primären Aminen zu Amiden reagieren. Da Proteine und Antikörper primäre Amine (z. B. in der Lysinseitenkette) besitzen, reagieren diese mit dem NHS-Estern und formen so eine kovalente Bindung zum Thiol-SAM. EDC und NHS werden in doppelter Konzentration separat in Reinstwasser gelöst, aliquotiert, bei -20°C gelagert und in allen Experimenten frisch aufgetaut und vor der Applikation gemischt. Nach der Aktivierung wird die NHS/EDC-Lösung abgenommen, einmal mit Reinstwasser weggespült und sofort die jeweilige Protein- bzw. Antikörperlösung auf die Elektrode aufgebracht ($2\text{ }\mu\text{l}$). Konzentration und Inkubationsdauer sind an entsprechender Stelle angegeben. Um eventuell verbliebene aktive Gruppen restlos ab zu sättigen, wird an die Inkubation mit Proteinen oder Antikörpern eine 30-minütige Behandlung mit einer wässrigen 5 %igen Ethanolaminlösung (w/v) angeschlossen. Danach werden die Elektroden zweimal mit PBS gewaschen und entweder für die jeweiligen Experimente verwendet oder in PBS bei 4°C gelagert.

3.6.3 Signalverstärkung mittels Präzipitatfällung katalysiert durch Peroxidase

Die Stabilität der Antikörper auf der Elektrode und die biosensorische Detektion von Analyten werden durch eine Signalverstärkungsreaktion nachgewiesen. Dafür werden die Elektroden mit einer 1:1000 Verdünnung des Chromogens 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) in 5 mM Acetatpuffer (pH 5) und 0,003 % Wasserstoffperoxid (*AEC-Staining-Kit* von Sigma-Aldrich) inkubiert. Die Peroxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid und die Oxidation von 3-Amino-9-ethylcarbazol zu dem wasserunlöslichen 3-Azo-9-ethylcarbazol, was als Präzipitat ausfällt (Abb. 14). Die Reaktion wird durch Waschen mit PBS gestoppt. Die Inkubationsdauer ist an entsprechender Stelle angegeben.

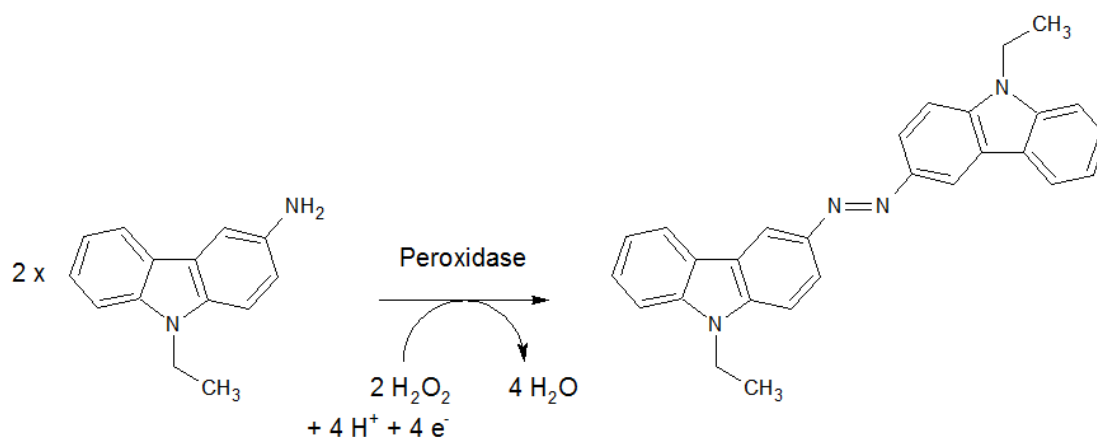


Abbildung 14: Reaktionsmechanismus für die durch Peroxidase katalysierte Redoxreaktion von 3-Amino-9-ethylcarbazol zu 3-Azo-9-ethylcarbazol. Die Oxidation von 3-Amino-9-ethylcarbazol verläuft unter Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser.

3.7 Biosensorische Detektion von Tenascin C

Zur biosensorischen Detektion von Tenascin C (TnC) kommt der 9WPtE-Elektrodenarraychip zum Einsatz. Die Goldarbeitselektroden werden wie unter 3.6.1 beschrieben mit einem MUDA-SAM beschichtet, welcher im Anschluss durch EDC und NHS aktiviert wird, um Proteine oder Antikörper zu binden (siehe 3.6.2). Das in den folgenden Experimenten verwendete TnC ist reines humanes TnC, gewonnen aus der humanen Glioma-Zelllinie U251. Es liegt in PBS gelöst vor (100 µg/ml) und wird bei -80 °C aliquotiert gelagert.

3.7.1 Indirekte Detektion von Tenascin C

Der erste Ansatz zur biosensorischen Detektion von Tenascin C ist ein indirektes Verfahren. Die Thiolschicht wird impedimetrisch vermessen (5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl), aktiviert (nach 3.6.2) und dann wird TnC in einer Konzentration von 1 µg/ml in Natriumboratspuffer (50 mM, pH 8,5) für 18 h appliziert. Danach werden verbliebene aktive Gruppen für 30 min mit einer 5 %igen Ethanolaminlösung (w/v) in Natriumboratspuffer abgesättigt. Als Kontrollen werden Elektroden mitgeführt, die statt mit TnC direkt mit 5 % Ethanolamin behandelt werden. Die mit TnC oder Ethanolamin beschichteten Elektroden werden daraufhin für 1 h mit 3 % BSA (w/v) in PBS behandelt, um unspezifische Bindungsstellen ab zu sättigen. Dann erfolgt die zweistündige Inkubation mit 1 µg/ml Maus-anti-TnC-Antikörpern (Millipore) in PBS mit 1 % (w/v) BSA. Es wird dreimal für 10 min mit PBS gewaschen und dann 1 µg/ml Zweitantikörper in PBS mit 1 % BSA (w/v) aufgetragen. Verwendet werden F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper, an die Peroxidase gekoppelt ist. An die einstündige Inkubation schließen sich erneut drei Waschgänge mit PBS für je 10 min an. Um den Effekt der Antikörperbindung zu verstärken, wird die an die Zweitantikörper gebundene Peroxidase für eine Signalverstärkungsreaktion genutzt. Mit dem *AEC-Staining-Kit* von Sigma-Aldrich wird, wie im Kapitel 3.6.3 beschrieben, eine Reaktionslösung hergestellt und für 5 min auf die Elektroden gegeben. Die Präzipitatzfällung wird durch Waschen mit PBS gestoppt und es wird erneut die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl gemessen. Am Ende des Experiments werden die Elektroden wie unter 3.10 beschrieben gereinigt.

3.7.2 Sandwich-Verfahren zur Detektion von Tenascin C

Beim *sandwich*-Verfahren zur biosensorischen Detektion von Tenascin C wird wiederum ein MUDA-SAM auf die Elektroden aufgebracht. Die Thiolschicht wird impedimetrisch vermessen (5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl), aktiviert (nach 3.6.2) und dann werden auf ihr Maus-anti-TnC-Antikörper (Millipore) in einer Konzentration von 1 µg/ml in Natriumboratspuffer (50 mM, pH 8,5) für 1 h inkubiert. Im Anschluss werden verbliebene aktive Gruppen für 30 min mit einer 5 %igen Ethanolaminlösung (w/v) in Natriumboratspuffer abgesättigt. Die

Elektroden werden für 30 min mit 1 % BSA (w/v) in PBS behandelt, um unspezifische Bindungsstellen ab zu sättigen. Dann erfolgt die einstündige Inkubation mit 10 µg/ml TnC in PBS, gefolgt von dreimaligem Waschen mit PBS. Daraufhin wird 1 h mit Ziege-anti-Tenascin-C-Antikörpern (10 µg/ml) inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Elektroden werden danach für eine weitere Stunden mit F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörpern inkubiert. An diese Antikörper ist Peroxidase gekoppelt. Auf die Zweitantikörperinkubation folgen erneut drei Waschgänge mit PBS an die sich die durch die Peroxidase katalysierte Signalverstärkung anschließt (siehe 3.6.3). Die Reaktion wird durch Waschen mit PBS nach 5 min gestoppt und es werden Impedanzspektren in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl gemessen. Als Kontrollen werden zum einen Elektroden mitgeführt, die nicht mit TnC sondern nur mit PBS-Puffer behandelt werden. Zum anderen werden Kontrollelektroden verwendet, bei denen auf die zweiten Primärantikörper (Ziege-anti-Tenascin-C-Antikörper) verzichtet wird. Am Ende des Experiments werden die Elektroden, wie unter 3.10 beschrieben, gereinigt.

3.7.3 Kompetitive biosensorische Detektion von Tenascin C

Als dritter Ansatz zur biosensorischen Detektion von Tenascin C wird ein kompetitives Verfahren getestet. Auf die Elektroden wird ein MUDA-SAM aufgebracht (3.6.1) und die Thiole werden aktiviert (3.6.2). Der aktivierte MUDA-SAM wird mit Maus-anti-TnC-Antikörpern in einer Konzentration von 10 µg/ml in Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8,5) für 30 min modifiziert. Danach werden verbliebene aktive Gruppen für 30 min mit einer 5 %igen Ethanolaminlösung(w/v) in Natriumboratpuffer abgesättigt. Die Elektroden werden daraufhin für 1 h mit TnC (unterschiedliche Konzentrationen, an entsprechender Stelle angegeben) in PBS behandelt. Als Kontrolle dienen einerseits Elektroden, die statt mit TnC nur mit dem Puffer PBS behandelt werden und andererseits Elektroden, die statt mit TnC mit BSA in äquimolarer Konzentration behandelt werden. Nach diesem Schritt erfolgt zweimaliges Waschen mit PBS, die 30-minütige Inkubation mit 10 µg/ml F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpern in PBS und erneut zweimaliges Waschen mit PBS. An die Zweitantikörper ist Peroxidase gekoppelt und sie sind spezifisch für die primären Antikörper auf dem MUDA-SAM. Allerdings wird die Bindung der Zweitantikörper an die Erstantikörper auf der Elektrode durch immobilisiertes TnC reduziert. Um das Signal der Bindung oder der Hemmung der Bindung der Zweitantikörper zu verstärken, wird erneut die Präzipitatfällung durch die Peroxidase ausgenutzt (3.6.3). Mit dem *AEC-Staining-Kit* wird die Reaktionslösung hergestellt und auf die Elektroden gegeben. Die Inkubationsdauer betrug 1 bzw. 3 min (an entsprechender Stelle angegeben). Die Reaktion wird durch Waschen mit PBS gestoppt und es werden Impedanzspektren in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl aufgezeichnet. Am Ende des Experiments werden die Elektroden, wie unter 3.10 beschrieben, gereinigt.

3.8 Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln

Zur biosensorischen Detektion von Polystyrolpartikeln kommt sowohl der 9WPtE-Elektrodenarraychip als auch der Sensorobjektträger zum Einsatz. Die Goldarbeits Elektroden werden wie unter 3.6.1 beschrieben mit einem MUDA-SAM beschichtet, welcher im Anschluss durch EDC und NHS aktiviert wird, um Antikörper zu binden (siehe 3.6.2). Die verwendeten Partikel sind aus Polystyrol mit einem mittleren Durchmesser von $1,84 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Sie sind mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern beschichtet, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dieser hat ein Anregungsmaximum von 470-490 nm und ein Emissionsmaximum von 520 nm und dient der fluoreszenzmikroskopischen Detektion der Partikel.

3.8.1 Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip

Auf den Elektroden werden MUDA-SAMs gebildet (3.6.1) und die Thiole werden aktiviert (3.6.2). Danach werden die Elektroden mit $1 \mu\text{g/ml}$ F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörpern in Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8,5) für 30 min inkubiert. Diese Antikörper sind mit Peroxidase markiert. Die verbliebenen aktiven Gruppen werden für 30 min mit einer 5 %igen Ethanolaminlösung (w/v) in Natriumboratpuffer abgesättigt. Auf die so geschaffenen Biosensorelektroden werden anschließend je 50 μl einer 0,01 mg/ml Partikelsuspension in PBS (ca. 3 Mio. Partikel/ml) aufgetragen und 30 min inkubiert. Dabei werden drei verschiedene Ansätze getestet: ohne zusätzliches BSA (in Stammlösung zu 0,05 % w/v enthalten), mit 0,5 % BSA (w/v) und mit 1 % BSA (w/v). Als Kontrollen werden Sensorobjektträger mitgeführt, die nicht mit Kaninchen-anti-Ziege-Antikörpern modifiziert werden. Die Inkubation erfolgt auf dem Taumler bei 30 U/min (Umdrehungen pro Minute). Danach wird dreimal je 10 min bei 30 U/min mit PBS gewaschen. Mit dem Fluoreszenzmikroskop werden Bilder der Partikel auf den Elektroden angefertigt und mit Hilfe von *ImageJ* wird die Zahl der Partikel pro mm^2 Elektrodenfläche bestimmt. Des Weiteren wird die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyano und 0,1 M KCl gemessen. Am Ende des Experiments werden die Elektroden, wie unter 3.10 beschrieben, gereinigt.

3.8.2 Biosensorische Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem Sensorobjektträger

Auf den Elektroden werden MUDA-SAMs gebildet (3.6.1) und die Thiole werden aktiviert (3.6.2). Die Elektroden werden mit $1 \mu\text{g/ml}$ F(ab')₂-Fragment-Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern in Natriumboratpuffer (50 mM, pH 8,5) für 30 min inkubiert (mit Cy2-Fluoreszenzfarbstoff). Die verbliebenen aktiven Gruppen werden für 30 min mit einer 5 %igen (w/v) Ethanolaminlösung in Natriumboratpuffer abgesättigt. Als Kontrollen werden Senso-

robjektträger mitgeführt, deren Arbeitselektroden mit einem unspezifischen Antikörper modifiziert werden (Kaninchen-anti-CD133). Die Polystyrolpartikel werden vor der Verwendung für 1 h mit 6,25 µg/ml F(ab')₂-Fragment-Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörpern (mit Peroxidase) in PBS bei 40 U/min (Taumler) inkubiert. Dann werden die Partikel bei 13000 U/min (Tischzentrifuge) für 3 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit PBS resuspendiert, für 10 min bei 40 U/min inkubiert und erneut bei 13000 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wird abermals abgenommen und mit PBS resuspendiert. Nach einer weiteren zentrifugation bei 13000 U/min für 3 min und dem Abnehmen des Überstands werden die Partikel in PBS mit 1 % BSA (w/v) resuspendiert. Dies ergibt eine Partikelkonzentration von 0,17 mg/ml (in PBS mit 1 % BSA, ca. 51 Mio. Partikel/ml). Die Partikelsuspension wird auf die vorbereiteten Biosensorelektroden appliziert. Jeweils 50 µl der Suspension werden für 30 min aufgetragen. Danach wird mit der *Äkta*-Pumpe für 10 min bei 0,1 ml/min Flussrate mit PBS gewaschen. Dabei wird der Waschpuffer über passende Schläuche durch die Durchflussskammer gepumpt, wobei der Fluss immer von der Arbeitselektrode zur Gegenelektrode verläuft. Mit dem Fluoreszenzmikroskop werden Bilder der Partikel auf den Elektroden angefertigt und mit Hilfe von *ImageJ* wird die Zahl der Partikel pro mm² Elektrodenfläche bestimmt. Des Weiteren wird die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanoide und 0,5 M KCl gemessen.

Um das Signal der gebundenen Partikel zu verstärken werden die Peroxidasemoleküle, die an die Kaninchen-anti-Ziege-IgG-Antikörper auf den Partikeln gekoppelt sind, genutzt. Mit dem *AEC-Staining-Kit* wird eine Reaktionslösung hergestellt und für 5, 10 und 20 min auf die Elektroden gegeben. Die Peroxidase an den Partikeln katalysiert daraufhin die Bildung des unter 3.6.3 beschriebenen Präzipitats. Die Reaktion wird durch Waschen mit PBS gestoppt und es wird die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanoide und 0,5 M KCl gemessen. Am Ende des Experiments werden die Elektroden, wie unter 3.10 beschrieben, gereinigt.

3.9 Biosensorische Detektion von HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen mit dem Sensorobjektträger

Die HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen und die HEK293-Wildtypzellen werden wie unter 3.1.2 beschrieben aus Flaschenkulturen geerntet. Sie werden allerdings nach dem Waschen wieder in PBS resuspendiert, die Zellzahl mit dem *CASY*[®] *TTC*-Zellzählgerät bestimmt und dann werden sie für die biosensorische Detektion verwendet.

Zur biosensorischen Detektion von HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen kommt der Sensorobjektträger zum Einsatz. Die Goldarbeitselektroden werden wie unter 3.6.1 beschrieben mit einem MUDA-SAM beschichtet. Die Thiole werden aktiviert (3.6.2) und für 30 min mit Ziege-anti-DCC-Antikörpern in einer Konzentration von 10 µg/ml in Natriumboratpuffer (50 mM, pH

8,5) inkubiert. Danach werden die verbliebenen aktiven Gruppen für 30 min mit einer 5 %igen Ethanolaminlösung (w/v) in Natriumboratpuffer abgesättigt. Auf die so geschaffenen Biosensorelektroden wird anschließend die HEK293_{DCC-eCFP}-Zellsuspension mit 2 Mio. Zellen/ml aufgetragen. Die Zellen werden auf den Elektroden für 5 min inkubiert. Als Kontrolle dienen Elektroden, die mit den HEK293-Wildtypzellen in derselben Konzentration ebenfalls 5 min inkubiert werden. Danach wird mit der *Äkta*-Pumpe für 10 min bei 3 ml/min Flussrate mit PBS gewaschen. Dabei wird der Waschpuffer über passende Schläuche durch die Durchflussskammer gepumpt, wobei der Fluss immer von der Arbeitselektrode zur Gegenelektrode verläuft. Nach dem Waschen werden Auflichtaufnahmen der Zellen angefertigt und mit *ImageJ* die Zellzahl pro mm² Elektrodenfläche bestimmt. Dann wird die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl gemessen. Die Zellen werden auf den Elektroden nach der Impedanzmessung noch für 5 min mit 5 µM Calcein-AM (Calcein-Acetoxymethylester) versetzt. Das dabei frei werdende Calcein fluoresziert bei einem Anregungsmaximum von 495 nm und einem Emissionsmaximum von 515 nm. Es zeigt vitale Zellen an. Es werden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verbliebenen vitalen Zellen auf den Elektroden angefertigt. Am Ende des Experiments werden die Elektroden, wie unter 3.10 beschrieben, gereinigt.

3.10 Recycling der Elektroden

Die Elektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips und der Sensorobjektträger werden nach der experimentellen Verwendung recycelt. Proteine oder Zellen werden direkt nach dem Experiment durch 15-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst. Dann wird mit Reinstwasser, Ethanol und erneut Reinstwasser gespült.

Vor jeder neuen Anwendung werden die Elektroden mit Aceton und Reinstwasser gewaschen, für 2 min mit Piranha-Lösung inkubiert und wiederum mit Reinstwasser gespült. Auf die chemische Reinigung der Elektroden folgt die zykl voltammometrische. Dazu wird in die Messkammern eine Lösung von Ferri-/Ferrocyanid und KCl gegeben, eine Referenzelektrode eingetaucht und mit Hilfe des Potentiostaten das Potential an den Arbeitselektroden zwischen 0,8 und -0,8 V (gegen das Referenzpotential) mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV geändert bis zur Stabilität der Zyklovoltammogramme, bzw. für mindestens 3 Zyklen. Die Konzentration von KCl und Ferri-/Ferrocyanid in der Messlösung wird entsprechend dem anschließenden Experiment gewählt.

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wird mit *Excel*[®] (2003/2007) und *R* 2.13.1 (Programmiersprache für statistisches Rechnen) durchgeführt. Die Daten sind, wenn nicht

anders angegeben, immer als arithmetische Mittelwerte \pm die Standardabweichungen angegeben. Die Anzahl der unabhängigen Experimente auf denen jeder Mittelwert beruht, ist an entsprechender Stelle angegeben. Für den paarweisen Vergleich von Mittelwerten wird der einfaktorielle ANOVA und der Bonferroni-Test verwendet. Die daraus bestimmten Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten werden in Form des Signifikanzwertes p angegeben. Um die Korrelation zweier Größen zu quantifizieren wird der Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet (r_P), bzw. das Bestimmtheitsmaß als Quadrat des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten (r_P^2).

4 Ergebnisse

„Die naturwissenschaftliche Frage ist die logische Hypothese, welche von einem bekannten Gesetz durch Analogie und Induction weiterschreitet; die Antwort darauf giebt das Experiment, welches in der Frage selbst vorgeschrieben liegt.“

(Rudolf Virchow 1821-1902)

4.1 Fertigung der 9WPtE-Elektrodenarraychips im *Lift-off*-Verfahren

Ziel der Arbeit war der Aufbau und die Anwendung elektrochemischer Biosensoren für die Tumordiagnostik. Als Basis für die Sensoren diente der Elektrodenarraychip 9WPtE (9-*well*-Platin-Elektrode), dessen Design mittels AutoCAD erstellt wurde. Die Fertigung der Elektrodenarraychips erfolgte im Reinraum im *Lift-off*-Verfahren (siehe 3.2.1). In Abb. 15A ist der Aufbau des Arrays dargestellt. Er bestand aus 3×3 Paaren von Goldarbeits- und Platinelektroden auf einem Borosilikatsubstrat mit $49 \times 49 \times 1 \text{ mm}^3$. Zur Haftung von Gold und Platin auf dem Borosilikat wurde zuvor eine Haftvermittlerschicht aus Chrom oder Indiumzinnoxid (ITO) aufgetragen. Die Gegenelektrode bildete jeweils einen offenen Kreisring um die ebenfalls kreisförmige Arbeitselektrode. Die Fläche der Arbeitselektrode betrug $2,84 \text{ mm}^2$ und die der Gegenelektrode $28,91 \text{ mm}^2$. Das entsprach einem Verhältnis von ca. 1:10. Beide Elektroden waren durch Leiterbahnen mit Kontaktpads am Rand des Arrays verbunden, welche der Verbindung der Elektroden zur Messeinheit dienten. Leiterbahnen und Kontaktpads waren aus Gold mit entsprechenden Haftvermittlern. Der Elektrodenarray war im 96-*well*-Maßstab (im ANSI-Standard, *American National Standards Institute*) gehalten. Um parallel nutzbare Reaktionsräume zu realisieren, wurden außerhalb des Reinraums 3×3 *wells* aus 96-*well*-Platten (ANSI Standard) ausgeschnitten, der Boden entfernt und die *wells* mittels Silikon auf das Substrat aufgeklebt. Die Gegenelektroden waren in ihrem Durchmesser so entworfen, dass sie genau mit den *wells* abschlossen. Um die Reaktionsräume von oben abschließen zu können, damit z. B. Verdunstung und Verunreinigung verhindert werden, wurden passgenaue Deckel gefräst.

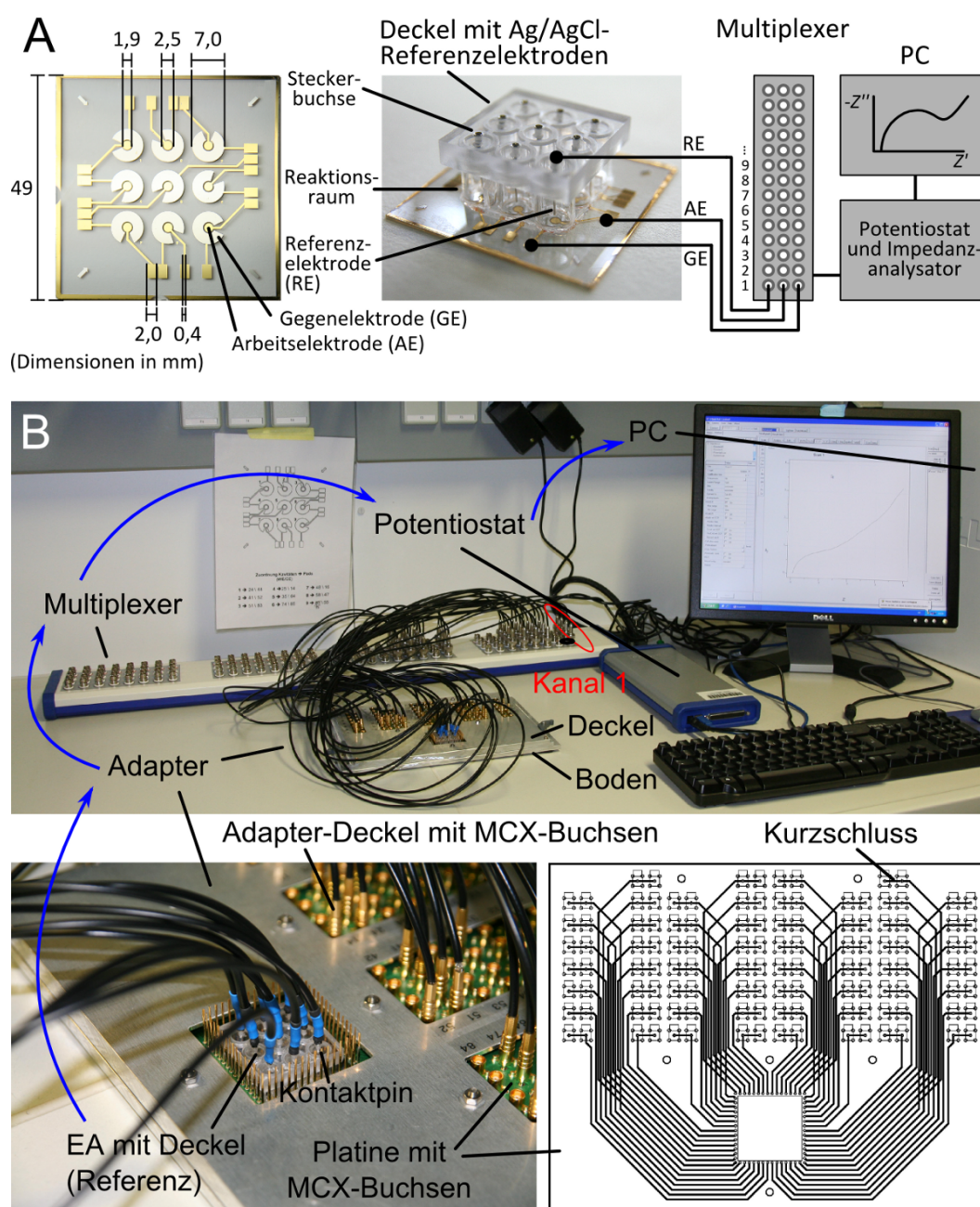


Abbildung 15: Aufbau der Messeinheit aus Elektrodenarraychip (EA), Adapter, Multiplexer, Potentiostat und Computer (PC). **A:** Der 96WPtE-Chip bestand aus 3×3 Paaren von Goldarbeits- (AE) und Platingegenelektroden (GE) auf Borosilikat im 96-well-Maßstab (ANSI). Die Ag/AgCl-Referenzelektroden (RE) wurden über einen Deckel integriert. **B:** Die Elektroden des Chips waren über Leiterbahnen mit Kontaktpads verbunden, die im Adapter kontaktiert wurden. Über den Adapter wurde der Array an den *HiMUX32*-Multiplexer angeschlossen (blaue Pfeile). Die REs wurden direkt mit dem Multiplexer verbunden, der dem Umschalten zwischen den einzelnen Kanälen diente. In einen Kanal wurden AE, GE und RE aus der gleichen Reaktionskammer gesteckt. Die Steckplätze für die AE und die 4. nicht gebrauchte Elektrode wurden auf der Platine kurzgeschlossen.

4.2 Fertigung von Referenzelektroden

In der Arbeit sollten elektrochemische Biosensoren basierend auf Elektrodenarraychips entwickelt und angewandt werden. Mittels der elektrochemischen Messmethoden Zykelvoltammetrie und Impedanzspektroskopie sollten die Biosensoren ausgelesen werden. Für die dabei stattfindenden Redoxreaktionen war eine Kontrolle des an der Arbeitselektrode anliegenden Potentials notwendig. Dies erforderte eine Dreielektrodenkonfiguration (Abb 16), die durch Arbeits- und Gegenelektroden auf dem 9WPtE-Elektrodenarraychip und Referenzelektroden in einem zum Chip passenden Deckel realisiert wurde. Strom floß in dieser Anordnung zwischen der jeweiligen Arbeits- und der Gegenelektrode und die Zellspannung wurde zwischen der Arbeits- und der dazugehörigen Referenzelektrode gemessen und geregelt.

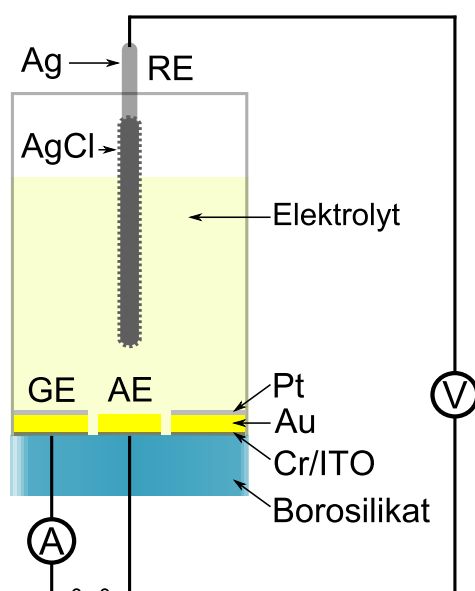


Abbildung 16: Querschnitt einer elektrochemischen Zelle aus Arbeits- (AE) und Gegenelektrode (GE) des Elektrodenarraychips und der integrierten Ag/AgCl-Referenzelektrode (RE) in Elektrolytlösung. A: In der Dreielektrodenkonfiguration fließt zwischen AE und GE ein Strom und zwischen AE und RE wird die Zellspannung gemessen und geregelt.

Der PMMA-Deckel (Polymethylmethacrylat), in den die Referenzelektroden integriert werden sollten, wurde auf die Ausmaße der 3×3 Reaktionsräume des Elektrodenarrays angepasst (Abb. 15A). Seine Kantenlängen betrugen je 3 cm und er hatte eine Höhe von 0,5 cm, wobei Aussparungen für die Wände der Reaktionsräume des Elektrodenarrays eingefräst wurden. Für die Fixierung der Referenzelektroden wurden 3×3 Steckerbuchsen so in den Deckel eingelassen, dass sie sich mittig in den Reaktionsräumen befanden. An die

Stecker wurden Silberdrähte gelötet und daran durch Galvanisierung AgCl abgeschieden. Die Silber/Silberchloridstäbe (Ag/AgCl) dienten als Referenzelektroden. Das Potential einer Ag/AgCl-Elektrode hängt von der Chloridionenkonzentration des mit ihr in Kontakt stehenden Elektrolyten ab. Um die Größe der Ag/AgCl-Elektroden minimal zu halten, wurde ein offenes Referenzsystem gewählt, bei dem sie direkten Kontakt zur Messlösung hatten. Die Stabilität dieses offenen Referenzsystems wurde untersucht und die Ergebnisse dieser Charakterisierung sind in 4.4 beschrieben.

4.3 Aufbau des Messsystems

9WPtE-Elektrodenarraychips und Referenzelektroden wurden für die elektrochemischen Messungen in ein Messsystem integriert, dessen Aufbau in Abb. 15 dargestellt ist. Um die Elektroden auf dem Borosilikatchip kontaktieren zu können, wurde ein Adapter gefertigt. Die zentral auf dem Chip gelegenen Elektroden waren über Leiterbahnen mit Kontaktpads verbunden und der Adapter stellte den Kontakt zwischen den Pads und den Eingängen eines Multiplexers her. Der Adapter bestand aus einem Deckel- und einem Bodenteil. Der Boden diente dem arretieren des Elektrodenarrays. Im Deckel befand sich eine Aussparung für den Array, um welche Federkontaktstifte auf einer Platine arrangiert waren. Wurde der Deckel auf den Boden mit eingesetztem Elektrodenarray gedrückt, so trafen die Kontaktstifte auf die Pads. Um nun den elektrischen Kontakt vom Adapter zum Multiplexer herzustellen, waren auf der Platine im Deckel des Adapters MCX-Buchsen integriert, die mit den Federkontaktstiften elektrisch verbunden waren. Über die MCX-Buchsen wurde durch Kabel mit MCX-Steckern der Kontakt zum Multiplexer aufgebaut. Die Referenzelektroden waren direkt über Kabel mit dem Multiplexer verbunden. Der Multiplexer (HiMUX32, IVIUM Technologies) diente der automatischen Schaltung der Kanäle, bzw. der zusammengehörigen Elektroden. Es wurde eine Dreielektrodenkonfiguration (Abb 16) genutzt, weswegen für jeden Kanal jeweils zwei der vier Steckplätze auf der Adapterplatine kurzgeschlossen wurden (siehe Abb. 15B). Der Multiplexer war verbunden mit dem Messgerät, dem Potentiostaten mit integrierter Funktion als Impedanzanalysator (CompactStat, IVIUM Technologies), welcher seinerseits mit einem Computer verbunden war.

4.4 Charakterisierung der Referenzelektroden

Die durch Galvanisierung hergestellten Ag/AgCl-Referenzelektroden wurden hinsichtlich der Stabilität ihres Redoxpotentials zykovoltammetrisch und impedimetrisch untersucht. Für die Charakterisierungen wurden die 9WPtE-Elektrodenarraychips verwendet. Als Messlösung diente ein Elektrolyt aus KCl als Leitsalz und Ferri-/Ferrocyanid (Kaliumhexacyanoferrat III

und II) als Redoxkomponente. Es wurden die für die Signalqualität optimalen Konzentrationen an KCl und Ferri-/Ferrocyanid ermittelt. Durch Vergleich der empirisch ermittelten Daten mit theoretischen Berechnungen sollte außerdem überprüft werden, ob das Referenzpotential für beliebige Konzentrationsbedingungen bestimmt werden kann.

4.4.1 Empirische Bestimmung der optimalen KCl-Konzentration

4.4.1.1 Zykl voltammetrie

Die für die zykl voltammetrische Signalqualität optimale Leitsalzkonzentration wurde experimentell ermittelt. Dazu wurde bei konstanter Redoxionenkonzentration von 5 mM Ferri-/Ferrocyanid die KCl-Konzentration (c_{KCl}) zwischen 0,01 und 1 M variiert. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,4 und 0,4 V mit einer Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scanrate) von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und der resultierende Stromfluss gemessen. Es wurden jeweils zwei Strompeaks gemessen, die auf eine Redoxreaktion des im Elektrolyten befindlichen Ferri-/Ferrocyanid hindeuteten (Abb. 17). Der positive Peak bei höherem Potential entsprach der Oxidation von Ferrocyanid und der negative Peak bei niedrigerem Potential der Reduktion von Ferricyanid. Eine detaillierte Beschreibung des Zustandekommens der typischen Form des Zykl voltammogramms wird in Kapitel 1.2 gegeben. Aus den aufgezeichneten Zykl voltammogrammen lassen sich bestimmte Kriterien zur Charakterisierung der Redoxreaktion und somit auch der Elektrodenoberflächen ablesen (siehe Tab. 2).

Wichtige Parameter für die Untersuchung der Redoxreaktionen sind die beiden Peakstromstärken. Sie nahmen für Oxidation und Reduktion ($I_{\text{p,a}}$, $I_{\text{p,k}}$) mit der KCl-Konzentration zu (Abb. 17, Tab. 3). Diese Zunahme lässt sich dadurch erklären, dass durch die Anwesenheit von mehr Leitsalzionen, die Ladungen der Ferri-/Ferrocyanidionen weniger durch Wasser abgeschirmt waren. Denn es wurden zunehmend mehr Ionen des Leitsalzes hydratisiert. Eine geringere Abschirmung der Ladungen der Redoxionen bedeutete eine stärkere Anziehungskraft zu der polarisierten Arbeitselektrode und somit einen verstärkten Umsatz von Ferri-/Ferrocyanidionen an der Elektrode. Das Verhältnis der Peakstromstärken für Oxidation und Reduktion ($I_{\text{p,a}}/I_{\text{p,k}}$) betrug für die KCl-Konzentrationen von 0,04 bis 0,1 M $1 \pm 0,2$. Gleich große Oxidations- und Reduktionsströme wiesen auf einen reversiblen Umsatz von Ferri-/Ferrocyanid hin. Bei Konzentrationen unter 0,04 M KCl zeigten die Zykl voltammogramme keine deutlich abgegrenzten Stromstärkepeaks. Die geringe Leitsalzkonzentration bewirkte einen ohmschen Spannungsabfall, wodurch weniger Ferri-/Ferrocyanid umgesetzt wurde und die Stromstärke sank.

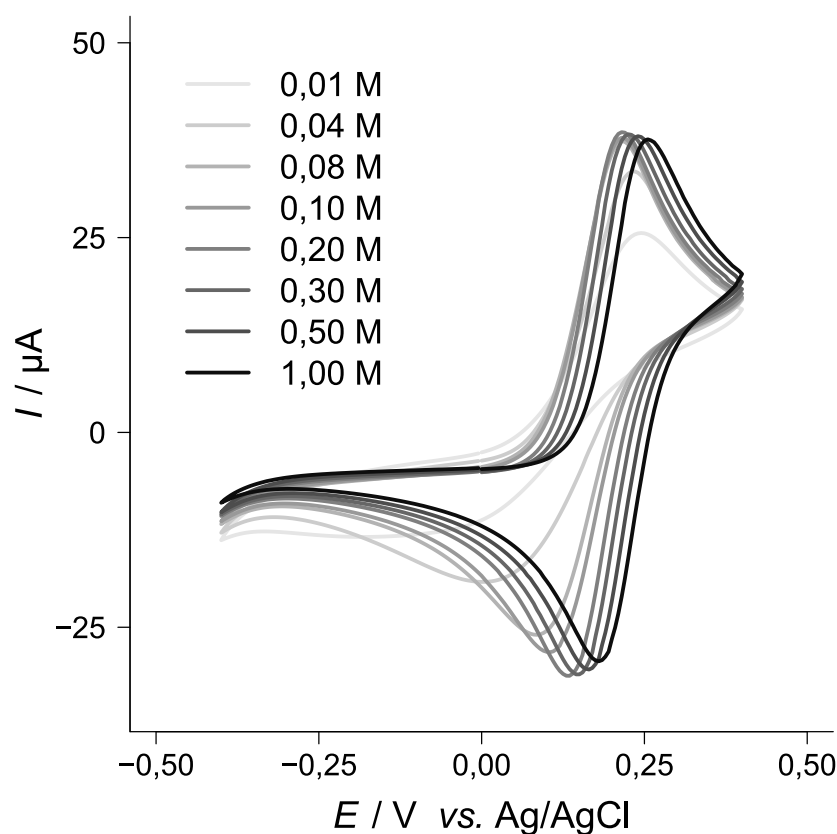


Abbildung 17: CV-Diagramme für verschiedene Konzentrationen des Leitsalzes KCl. Die Zyklovoltammogramme für KCl-Konzentrationen von 0,01 bis 1 M wiesen eine Verschiebung hin zu größeren Potentialen auf. Mit der Leitsalzkonzentration stieg auch die Höhe der Peakstromstärken. Die abgebildeten Kurven sind die Rohdaten einer Elektrode bei einer Konzentration von 5 mM Ferri-/Ferrocyanid.

Tabelle 3: CV-Parameter $I_{p,a}$, $I_{p,k}$, E'° (vs. Ag/AgCl) und ΔE_p als Funktion der Konzentration des Leitsalzes (c_{KCl}). Alle Werte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens acht Elektroden bei einer Konzentration von 5 mM Ferri-/Ferrocyanid.

c_{KCl}/M	$I_{p,a}/\mu A$	$I_{p,k}/\mu A$	E'°/mV	$\Delta E_p/mV$
0,04	$25,2 \pm 1,4$	$-21,1 \pm 0,7$	114 ± 4	228 ± 13
0,08	$30,1 \pm 1,3$	$-32,0 \pm 1,0$	152 ± 5	128 ± 5
0,10	$31,0 \pm 1,2$	$-35,1 \pm 1,0$	160 ± 6	109 ± 3
0,20	$31,7 \pm 0,9$	$-39,6 \pm 1,3$	177 ± 7	83 ± 3
0,30	$30,9 \pm 1,0$	$-40,5 \pm 1,3$	191 ± 12	77 ± 3
0,50	$29,2 \pm 0,7$	$-40,9 \pm 1,3$	203 ± 2	77 ± 3
1,00	$27,3 \pm 1,2$	$-41,5 \pm 1,4$	220 ± 4	76 ± 2

Alle gefertigten Elektroden zeigten eine Zunahme der Peakstromstärken für Oxidation und Reduktion mit der Wurzel der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scanrate), wiederum ein Kriterium für eine reversible Redoxreaktion (Abb. 18). Denn nur für reversible Reaktionen gilt die Randles-Sevcik-Gleichung (Formel 3), die eine direkte Proportionalität zwischen Peakstromstärke und Scanrate vorgibt. Allerdings nahm die Peakseparation ebenfalls mit der Scanrate zu, was einen quasi-reversiblen Reaktionsmechanismus vermuten ließ (siehe Tab. 2). Bei einer quasi-reversiblen Reaktion ist die Reaktionsgeschwindigkeit verringert, da der Durchtritt der Redoxionen zur Elektrode gehemmt ist (Durchtrittskontrolle). Mit Erhöhung der Scanrate bleibt nicht genug Zeit für die langsamere Redoxreaktion, dadurch nimmt die Ferri-/Ferrocyanid-Konzentration an den Elektroden erst bei höheren Potentialen (in positive bzw. negative Richtung) ab und die Stromstärkepeaks verschieben sich in Richtung Potentialvorschub.

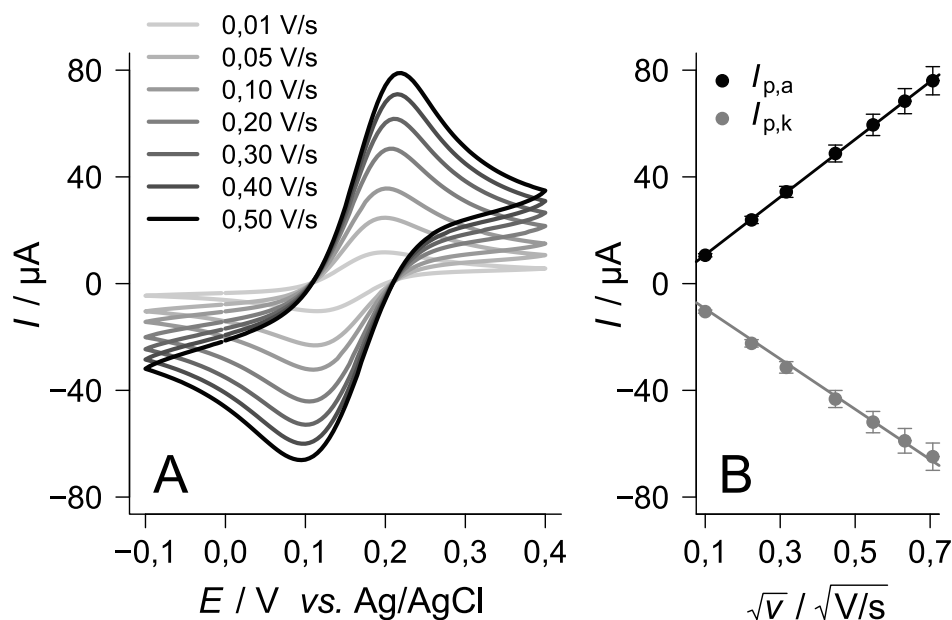


Abbildung 18: CV-Messungen in Abhängigkeit von der Potentialvorschubgeschwindigkeit. A: Abgebildet sind beispielhaft Zyklovoltammogramme einer Elektrode gemessen mit Scanraten (ν) von 0,01 bis 0,5 V/s (in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl). Mit der Scanrate stiegen die Peakstromstärken für Oxidation ($I_{p,a}$) und Reduktion ($I_{p,k}$) an. Der genaue Zusammenhang ist in B verdeutlicht. $I_{p,a}$ und $I_{p,k}$ nahmen linear mit der Wurzel der Scanrate zu. Die Datenpunkte von B sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen für die Peakstromstärken von vier unabhängigen Experimenten mit mindestens sieben Elektroden pro Experiment. Das Bestimmtheitsmaß für beide lineare Regressionen betrug 0,999.

Die CV-Diagramme in Abb. 17 zeigen noch eine zweite Änderung in Abhängigkeit von c_{KCl} . Das gegen die Ag/AgCl-Referenz gemessene formale Zellpotential (E'°) von Ferri-/Ferrocya-

nid stieg mit der KCl-Konzentration, was in der Verschiebung der Zyklovoltammogramme zu höherer Spannung sichtbar wurde. Da ein offenes Referenzsystem verwendet wurde, hing das Potential der Ag/AgCl-Referenz von der Konzentration der Chloridionen ab. Das Referenzpotential bestimmte wiederum das gemessene Zellpotential E'^o . Eine theoretische Betrachtung der Zusammenhänge befindet sich in Kapitel 4.4.2. Die Werte für das formale Zellpotential berechnen sich aus dem arithmetischen Mittelwert der beiden Peakpotentiale (bei identischen Diffusionskoeffizienten wie bei Ferri-/Ferrocyanid^[113], siehe 1.2). Die Daten für das Zellpotential zeigten nur geringe Standardabweichungen von 1-6 %, was für ein stabiles Referenzsystem sprach, bei dem keine Unterschiede zwischen unabhängig durchgeführten Experimenten oder Referenzelektroden beobachtet wurden.

Bei Betrachtung der Position der Peaks fiel noch eine weitere Veränderung in Abhängigkeit der KCl-Konzentration auf. Die Separation der Peaks (ΔE_p) erhöhte sich mit sinkender KCl-Konzentration. Von 1 bis 0,04 M KCl verdreifachte sich diese. Für eine reversible Reaktion, bei der wie bei Ferri-/Ferrocyanid ein Elektron übertragen wird, sollte die Peakseparation entsprechend der Nernstschen Gleichung idealerweise 59 mV betragen (Formel 2). Im Experiment werden mit sauberen Elektroden Werte zwischen 70 und 100 mV erreicht^[114–117]. Die gemessene Zunahme der Peakseparation mit sinkender c_{KCl} auf bis zu 228 ± 13 mV für 0,04 M KCl beruhte auf dem ohmschen Spannungsabfall zwischen Referenz und Arbeitselektrode. Dadurch reagierten Ferri- und Ferrocyanid erst bei höherer angelegter Spannung (in positive bzw. negative Richtung) an der Elektrode, wodurch die Konzentration auch erst mit höherer Spannung sank. Dies führte zu einem Verschieben der Stromstärkepeaks in Richtung des Potentialvorschubs.

Die zykelvoltammetrischen Messungen zeigten, dass ab einer KCl-Konzentration von 0,08 M deutlich identifizierbare Peaks für Oxidation und Reduktion beobachtet werden können. Mit den Ag/AgCl-Referenzelektroden wurden bei allen KCl-Konzentrationen niedrige Standardabweichungen für das Zellpotential von maximal 6 % gemessen. Somit konnte das Referenzsystem als stabil angesehen werden. Da für jede Reaktionskammer der Elektrodenarraychips eine individuelle Referenzelektrode eingesetzt wurde, belegen die geringen Standardabweichungen auch, dass die einzelnen Referenzelektroden identische Messergebnisse lieferten.

4.4.1.2 Impedanzspektroskopie

Mittels der Impedanzspektroskopie sollte in der Arbeit die Redoxreaktion von (Ferri-/Ferrocyanid) an der Arbeitselektrode gemessen werden. Indirekt sollte dadurch der Bedeckungsgrad bzw. die Reinheit der Elektroden überprüft werden.

Bei einer Impedanzmessung wird eine konstante Wechselspannung angelegt und die Stromantwort gemessen. Durch kapazitive und induktive Widerstände im Stromkreis tritt eine Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom auf. Demnach lässt sich einer Impedanzmes-

sung einerseits das Verhältnis der Amplituden von Wechselspannung und -strom entnehmen, was dem Wechselstromwiderstand, der Impedanz, entspricht. Andererseits lässt sich auch die Phasenverschiebung zwischen Spannung und Strom entnehmen. Für die Vereinfachung von Berechnungen wird die Impedanz nicht als reale zeitabhängige Größe sondern als komplexe Größe dargestellt. Daraus ergeben sich zwei Darstellungsmöglichkeiten. Die Impedanz kann in Polarkoordinaten durch ihren Betrag und die Phasenverschiebung gegen die Frequenz angegeben werden oder in kartesischen Koordinaten durch ihren imaginären Anteil (Z'') gegen den realen Anteil (Z'). Auf die Umrechnung von Polarkoordinatenform in die kartesische Form wird unter 1.3 genauer eingegangen. Die komplexe Impedanz ist anders als der ohmsche Widerstand abhängig von der Frequenz der angelegten Wechselspannung. Die Gesamtimpedanz setzt sich aus den Einzelimpedanzen der Schaltelemente zusammen. Je nach Frequenz dominieren bestimmte Elemente die Gesamtimpedanz. Wird die Impedanz bei mehreren Frequenzen gemessen, also ein Impedanzspektrum aufgenommen, lassen sich daraus Rückschlüsse auf den Schaltkreis ziehen.

Um eine Redoxreaktion wie die von Ferri-/Ferrocyanid zu untersuchen, musste an der Arbeitselektrode ein Gleichspannungssignal angelegt werden, das dem formalen Standardpotential der Redoxsubstanz entsprach (offenes Zellpotential, E'°). Dafür wurde eine Dreielektrodenkonfiguration aus Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode gewählt (Abb. 16). Das Gleichspannungssignal wurde für die Impedanzmessung durch ein Wechselspannungssignal überlagert und die Stromantwort auf diese Störung verfolgt. Durch Auswertung der Messdaten mittels geeigneten Modellen (Ersatzschaltbildern) konnten die Einzelimpedanzen der Elemente des Schaltkreises analysiert werden. Dafür wurden die Daten mit den mathematischen Modellen angepasst und aus den Anpassungen die Parameter des Modells berechnet. Die verwendete Anpassungsroutine ist unter 3.5.5.1 beschrieben.

Als Modell für die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid an der sauberen Arbeitselektrode wurde ein abgewandeltes Randles-Modell^[80] gewählt (siehe dazu Abb. 6). Es bestand aus einer Reihenschaltung von Ladungstransferwiderstand (R_{ct}) und Warburgimpedanz. Parallel dazu wurde ein konstantes Phasenelement (CPE) geschaltet und in Reihe zu dem Komplex aus R_{ct} , Warburgimpedanz und CPE befand sich der Lösungsmittelwiderstand (R_s) ($((R_{ct} - Z_W) || CPE) - R_s$). Der Ladungstransferwiderstand ist der Widerstand, der der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid an der Arbeitselektrode entgegen steht. Die Warburgimpedanz ist ein Element, welches die Diffusionsabhängigkeit der Redoxreaktion widerspiegelt. Sie wird durch den Warburgkoeffizienten charakterisiert. Das CPE ist ein nicht-idealer Kondensator, der die Ionendoppelschicht an der Elektrode repräsentiert. Durch Inhomogenitäten der Elektrodenoberfläche kann oft nicht von einem idealen Kondensator ausgegangen werden, weswegen er durch das empirische CPE ersetzt wird. Das CPE wird durch zwei Parameter charakterisiert. Der Parameter A ist vergleichbar mit der Kapazität der elektrochemischen

Doppelschicht und entspricht ihr, wenn für den Parameter $n = 1$ gilt. Der Lösungsmittelwiderstand repräsentiert den Widerstand des inneren Elektrolyten und hängt von dessen Ionenstärke ab. Die Definitionen aller Schaltelemente sind in Tab. 1 aufgeführt.

Für verlässliche Impedanzmessungen muss die Unabhängigkeit der gemessenen Impedanz von der Höhe der Wechselstromamplitude gewährleistet sein. Das Verhältnis von Spannung und Strom ist im Wechselstromkreis jedoch nicht linear wie bei Gleichstrom. Wird jedoch nur eine sehr kleine Spannungsamplitude verwendet, so kann in diesem Bereich von einer Quasi-Linearität ausgegangen werden^[79]. Durch Messung der Impedanz bei festen Spannungsamplituden zwischen 1 und 200 mV wurde ein Bereich für die Spannungsamplitude bestimmt, in dem das Signal-Rausch Verhältnis möglichst groß ausfiel und trotzdem Linearität gewährleistet war. Dazu wurde die Impedanz zwischen 1 Hz und 100 kHz bei 5 mM Ferri-/Ferrocyano (1:1) in 0,1 M KCl aufgezeichnet.

Abb. 19 zeigt die Impedanzspektren für die unterschiedlichen Wechselspannungsamplituden in Form von Nyquistplots. In solch einem Nyquistplot ist die Impedanz in kartesischer Form dargestellt, mit dem negativen imaginären Anteil der Impedanz ($-Z''$) als Funktion des realen (Z') Anteils. Dabei entspricht jeder Datenpunkt einer Frequenz, die in den dargestellten Kurven in Abb. 19 von rechts nach links zunimmt. Der Nyquistplot erlaubt ein direktes Ablesen der Parameter des untersuchten Systems. So entspricht beispielsweise der Ladungstransferwiderstand dem Durchmesser des Halbkreises, den die Messdaten im Nyquistplot beschreiben (siehe Abb. 6B). Die Nyquistplots, die in Abb. 19 zu sehen sind, stellen Mittelwertskurven von vier unabhängigen Experimenten mit mindestens sieben Elektroden dar. Jede Kurve entspricht den gemittelten Messdaten für eine feste Wechselspannungsamplitude. Über 50 mV ist eine Änderung im Impedanzspektrum zu erkennen. Der Halbkreisdurchmesser verringert sich ab dieser Spannungsamplitude. Um für die Messungen eine Unabhängigkeit der Impedanz von der Spannungsamplitude zu gewährleisten, wurde daher eine Amplitude von 10 mV gewählt. Eine niedrigere Spannungsamplitude wurde nicht verwendet, um eine stabile Signalqualität zu erreichen.

Die für die Qualität des Impedanzsignals optimale KCl-Konzentration wurde mit einer Konzentrationsreihe von 0,01 bis 0,5 M bestimmt. Von den Redoxspezies Ferri-/Ferrocyano wurden dabei insgesamt konstante 5 mM (jeweils 2,5 mM) eingesetzt. Es wurde eine Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential angelegt und die Impedanz für Frequenzen von 1 Hz bis 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) gemessen. Mit steigender KCl-Konzentration zeigte sich im Nyquistplot eine Verringerung des Durchmessers des typischen Halbkreises, den die Messdaten beschrieben, was eine Verringerung des Ladungstransferwiderstands R_{ct} bedeutete (Abb. 20A). Außerdem verschob sich der Schnittpunkt der Impedanzspektren mit der realen x-Achse im Bereich hoher Frequenzen zu kleineren Z' -Werten, wenn die KCl-Konzentration erhöht wurde (Abb. 20B). Da der Schnittpunkt mit der

realen Achse dem R_s entspricht (siehe hierzu Abb. 6B), sank dieser folglich mit steigender KCl-Konzentration.

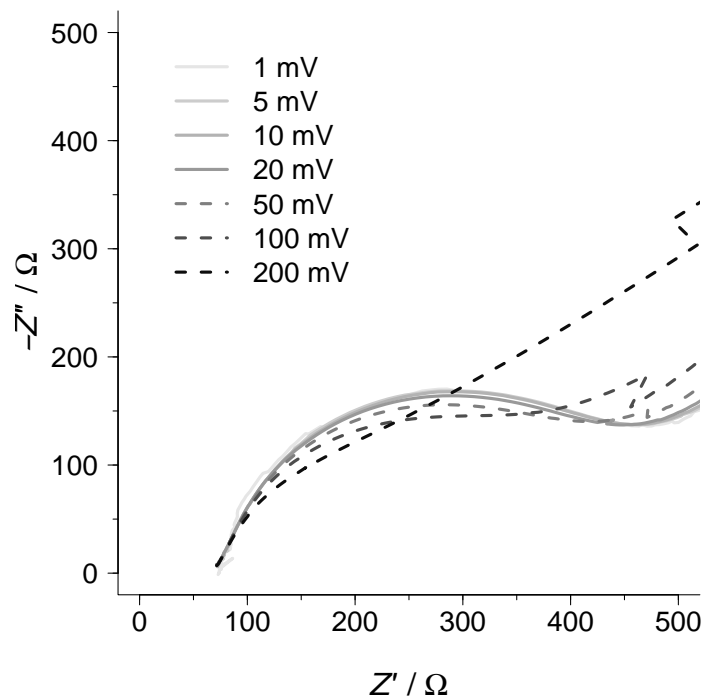


Abbildung 19: Einfluss der Wechselstromamplitude auf die Impedanzmessung. Abgebildet sind die Nyquistplots für Wechselspannungsamplituden von 1, 5, 10, 20, 50, 100 und 200 mV in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl. Ab 50 mV änderte sich der Kurvenverlauf (mit gestrichelter Linie verdeutlicht). Alle Kurven sind Mittelwerte der Messdaten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens sieben Elektroden.

Wird der Gesamtbetrag der Impedanz in die Einzelanteile des modifizierten Randles-Modells^[80] mit Ladungstransferwiderstand R_{ct} , Warburgimpedanz, konstantem Phasenelement (CPE) und Lösungsmittelwiderstand zerlegt, so ergibt sich ein genaueres Bild der Veränderungen. In Abb. 21 sind die durch die numerische Anpassungsroutine (siehe 3.5.5.1) berechneten Parameter der Schaltelemente gegen die KCl-Konzentration aufgetragen: in 21A Lösungsmittelwiderstand (R_s) und Ladungstransferwiderstand (R_{ct}), in 21B bzw. C die Parameter A und n des konstanten Phasenelements (CPE) und in 21D σ als Parameter der Warburgimpedanz. Das der Anpassung zugrundeliegende Ersatzschaltbild ist in 21B zu sehen.

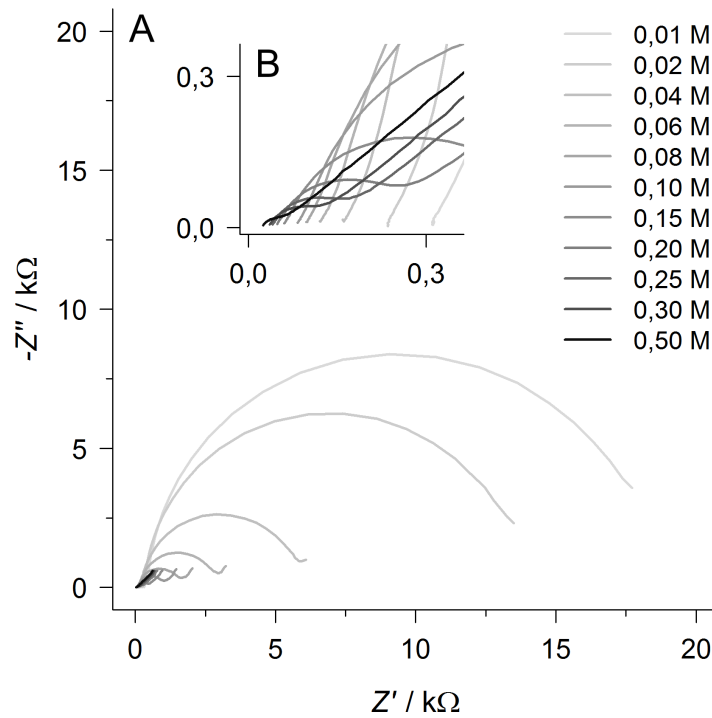


Abbildung 20: Nyquistplots für verschiedene Konzentrationen des Leitsalzes KCl (c_{KCl}). **A:** Beispielhaft dargestellt sind die Nyquistplots einer Elektrode für KCl-Konzentrationen von 0,01 bis 0,5 M (bei 5 mM Ferri-/Ferrocyanid). Sie zeigten eine deutliche Verkleinerung des Durchmessers des typischen Halbkreises mit ansteigender KCl-Konzentration. **B** zeigt eine Vergrößerung aller Kurven im Bereich hoher Frequenzen. Der Schnittpunkt der Kurven mit der x-Achse verschob sich mit steigender KCl-Konzentration zu kleineren Z' Werten.

Die numerische Auswertung bestätigte die in den Nyquistplots beobachtete Abnahme des Lösungsmittelwiderstands und des Ladungstransferwiderstands mit steigender KCl-Konzentration. Die Abnahme für R_s erklärte sich mit der steigenden Anzahl von Ladungsträgern bei Erhöhung von c_{KCl} . Die Anwesenheit von mehr Ladungsträgern verringerte den Widerstand des Elektrolyten. R_{ct} nahm mit c_{KCl} ab, weil einerseits die Ladungen der Ferri-/Ferrocyanidionen bei Erhöhung der Leitsalzkonzentration weniger durch Wasser abgeschirmt waren. Denn es wurden zunehmend mehr Ionen des Leitsalzes hydratisiert. Eine geringere Abschirmung der Ladung der Redoxionen bedeutete eine stärkere Anziehungskraft zu der polarisierten Arbeitselektrode und somit einen geringeren Widerstand für die Redoxreaktion an der Elektrode. Andererseits verringerte sich durch steigende KCl-Konzentration die Debye-Hückel-Länge κ^{-1}

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 RT}{2F^2 c_0}} \quad (15)$$

mit ϵ_0 bzw. ϵ_r als Permittivität im Vakuum und relativer Permittivität, R als universeller Gaskonstante, T als Temperatur in Kelvin, F als Faradaykonstante und c_0 als molarer Konzentration des Elektrolyten (gilt für monovalente 1:1 Elektrolyte). Die Debye-Hückel-Länge bestimmt die Dicke der Ionendoppelschicht. Sie ist ungefähr $1,5 \kappa^{-1}$ dick^[77]. κ^{-1} und demnach auch die Dicke der Ionendoppelschicht verringerten sich durch Erhöhung der KCl-Konzentration. Dies kam einer Verringerung der Dicke des Dielektrikums gleich, wodurch der Ladungstransfer an der Elektrode erleichtert wurde und somit R_{ct} abnahm.

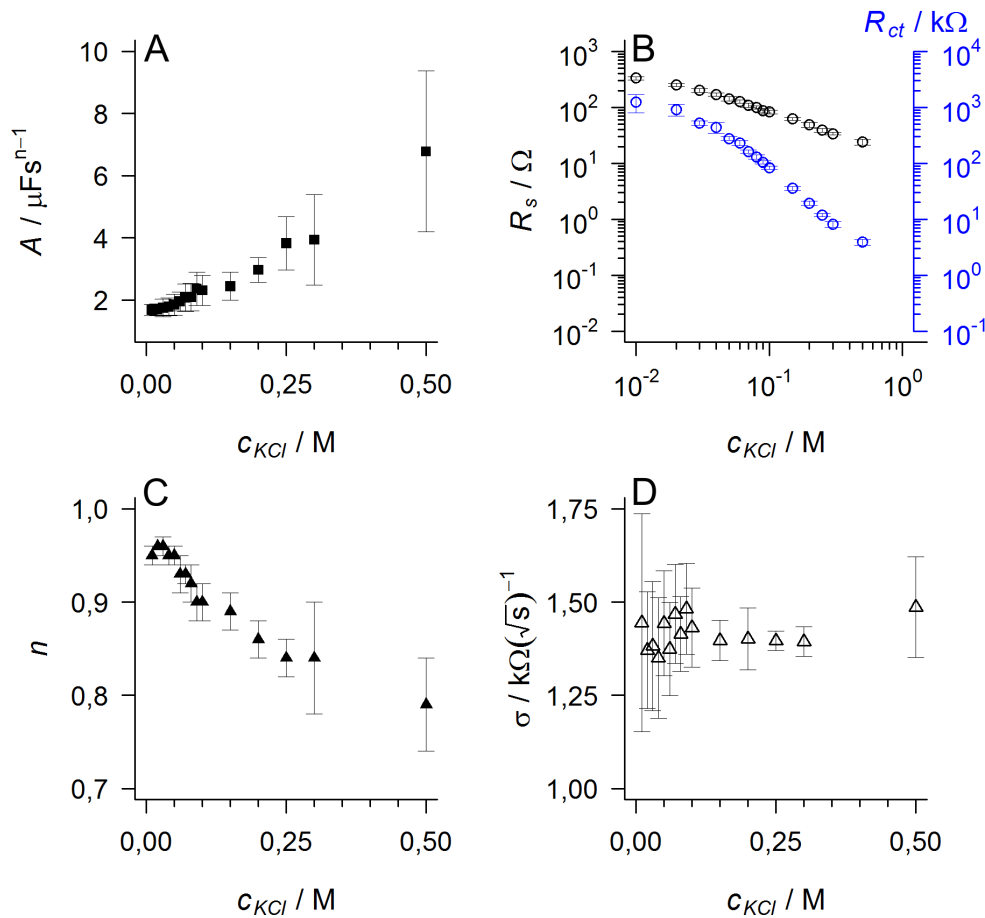


Abbildung 21: Impedanzparameter R_s , R_{ct} , A , n und σ als Funktion der Konzentration des Leitsalzes KCl (c_{KCl}). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens acht Elektroden bei einer Ferri-/Ferrocyanid-Konzentration von 5 mM. **A:** R_s und R_{ct} (gefüllter Kreis) sanken mit steigender KCl-Konzentration, wobei die Achsen für bessere Sichtbarkeit der Daten logarithmisch dargestellt sind. **B:** Der CPE-Parameter A stieg mit zunehmender KCl-Konzentration (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]). **C:** Der CPE-Parameter n nahm mit c_{KCl} geringfügig ab. **D:** Der Warburgkoeffizient σ zeigte keine signifikante Änderung bei Variation von c_{KCl} .

Der Parameter A , der für das konstante Phasenelement wie die Kapazität für den Kondensator ist, stieg mit der KCl-Konzentration an. Genauer gesagt vervierfachte sich der Wert von 0,01 bis 0,5 M KCl (Tab.4). Die Zunahme von A beruhte ebenfalls auf der Verringerung der Dicke des Dielektrikums mit steigender c_{KCl} . Die Kapazität und demzufolge auch A verhalten sich indirekt proportional zur Dicke des Dielektrikums (siehe Formel 16).

$$C = \epsilon_r \epsilon_0 \frac{A}{d} \quad (16)$$

Der zweite Parameter des CPE, n , nahm mit steigender c_{KCl} geringfügig ab, worin sich Inhomogenitäten durch die Veränderung der Ionendoppelschicht widerspiegeln. Für σ , den Parameter der Warburgimpedanz, ließ sich mit Steigerung der KCl-Konzentration keine signifikante Änderung feststellen. Der Widerstand der Diffusionsschicht, der durch die Warburgimpedanz modelliert wird, zeigte demnach keine Abhängigkeit von c_{KCl} .

Tabelle 4: Impedanzparameter R_s , R_{ct} , A , n und σ als Funktion der KCl-Konzentration (c_{KCl}). Alle Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens acht Elektroden bei einer Ferri-/Ferrocyano-Konzentration von 5 mM.

c_{KCl}/M	R_s/Ω	$R_{ct}/\text{k}\Omega$	$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	n	$\sigma/\text{k}\Omega(\sqrt{s})^{-1}$
0,01	334 ± 22	$12,52 \pm 4,57$	$1,68 \pm 0,18$	$0,95 \pm 0,01$	$1,45 \pm 0,29$
0,02	252 ± 17	$9,20 \pm 2,22$	$1,69 \pm 0,18$	$0,96 \pm 0,01$	$1,37 \pm 0,16$
0,04	170 ± 11	$4,40 \pm 0,93$	$1,78 \pm 0,28$	$0,95 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,16$
0,06	127 ± 9	$2,33 \pm 0,28$	$1,95 \pm 0,30$	$0,93 \pm 0,02$	$1,37 \pm 0,13$
0,08	100 ± 7	$1,31 \pm 0,12$	$2,09 \pm 0,44$	$0,92 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,10$
0,10	83 ± 6	$0,84 \pm 0,05$	$2,31 \pm 0,48$	$0,90 \pm 0,02$	$1,43 \pm 0,11$
0,15	62 ± 4	$0,36 \pm 0,03$	$2,44 \pm 0,45$	$0,89 \pm 0,02$	$1,40 \pm 0,05$
0,20	49 ± 5	$0,19 \pm 0,02$	$2,97 \pm 0,40$	$0,86 \pm 0,02$	$1,40 \pm 0,08$
0,25	39 ± 3	$0,12 \pm 0,01$	$3,82 \pm 0,86$	$0,84 \pm 0,02$	$1,40 \pm 0,03$
0,30	34 ± 2	$0,08 \pm 0,01$	$3,94 \pm 1,46$	$0,84 \pm 0,06$	$1,39 \pm 0,04$
0,50	24 ± 3	$0,04 \pm 0,01$	$6,78 \pm 2,59$	$0,79 \pm 0,05$	$1,49 \pm 0,14$

Durch die impedimetrischen Untersuchungen konnte die Abhängigkeit der Impedanzparameter von der KCl-Konzentration bestimmt werden. Für den Aufbau von Biosensoren basierend auf den Elektrodenarraychips war die Bestimmung einer für die Signalqualität optimalen KCl-Konzentration in der Messlösung notwendig. Ziel war ein möglichst geringer Ausgangswert für den Ladungstransferwiderstand einer sauberen Elektrode, um anschließende Veränderungen an der Elektrode, z. B. durch den Aufbau funktionaler Oberflächen, sensitiv detektieren zu können. Ist der Wert für eine saubere Elektrode schon sehr groß, wie z. B. bei Einsatz

einer geringen Leitsalzkonzentration von 0,01 M KCl, so können Erhöhungen des R_{ct} durch die Immobilisierung von Molekülen möglicherweise nicht mehr nachgewiesen werden. Daher wurde in allen folgenden Messungen eine KCl-Konzentration von 0,1 M und höher gesetzt.

4.4.2 Berechnung des Redoxpotentials der Referenzelektrode

Da die verwendeten Ag/AgCl-Referenzelektroden nicht durch ein Diaphragma von der eigentlichen Messlösung getrennt waren und somit keine eigene Elektrolytlösung besaßen, musste die Messlösung selbst eine ausreichende KCl-Menge aufweisen, um ein konstantes Referenzpotential zu gewährleisten. Durch Vergleich der empirisch ermittelten Daten mit theoretischen Berechnungen sollte überprüft werden, ob das Referenzpotential für beliebige Konzentrationsbedingungen berechnet werden kann.

Das Halbzellenpotential einer Ag/AgCl-Elektrode ergibt sich wie folgt aus der Nernstschen Gleichung (siehe Formel 2):

$$e_{\text{Ag/AgCl}} = e_{\text{Ag/AgCl}}^{\circ} - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl}^-} \quad (17)$$

Hierbei ist $e_{\text{Ag/AgCl}}^{\circ}$ das Standardpotential des Redoxsystems Ag/AgCl, R die universelle Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin, F die Faradaykonstante und a_{Cl^-} die Aktivität der Chloridionen. Experimentell zugänglich sind aber nur Potentiale zwischen zwei Elektroden, der Arbeits-(AE) und der Referenzelektrode (RE). Das messbare Zellpotential ist durch die Differenz der beiden Halbzellenpotentiale gegeben:

$$E = e_{\text{AE}} - e_{\text{RE}} \quad (18)$$

Zur Sicherstellung eines konstanten Referenzpotentials muss die Chloridionenkonzentration in der Messlösung relativ hoch sein. Hierbei kommt es zu Abweichungen vom idealen Verhalten und die Aktivität a_{Cl^-} kann nicht mehr mit der Konzentration c_{Cl^-} gleich gesetzt werden. Als Korrekturfaktor wird der Aktivitätskoeffizient eingeführt mit dessen Hilfe sich die Aktivitäten aus den bekannten Konzentrationen berechnen lassen. Allgemein gilt:

$$a_i = y_{\pm} \cdot c_i \quad (19)$$

Hierbei ist a_i die Aktivität der Komponente i , y_{\pm} der individuelle Aktivitätskoeffizient und c_i die molare Konzentration der Komponente i . Für die Berechnung der Aktivitätskoeffizienten

ist die Ionenstärke I von zentraler Bedeutung. I berechnet sich durch

$$I = 0.5 \sum_i z_i^2 c_i \quad (20)$$

mit z_i als Ladungszahl der Ionensorte i . Die Ionenstärke wird durch alle in der Lösung vorhandenen Ionen bestimmt. Bei 1:1-Elektrolyten, wie z. B. KCl, ist die Ionenstärke gleich der Konzentration des zugegebenen Elektrolyts. Bereits bei sehr kleinen Ionenstärken von $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kommt es zu Abweichungen zwischen Aktivität und molarer Konzentration von ca. 4 %. Die Berechnung der benötigten Aktivitätskoeffizienten erfolgt mithilfe der Debye-Hückel-Theorie. Das Debye-Hückel-Grenzgesetz gilt nur für Ionenstärken $I \leq 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ und hat die Form:

$$\lg y_{\pm} = -A z_i^2 \sqrt{I} \quad (21)$$

A ist eine theoretisch berechenbare Konstante für die gilt

$$A = \frac{1}{\ln 10} \left(\frac{e^2}{4 \epsilon_0 \epsilon_r k T} \right)^{3/2} \left(\frac{2 N_A}{\pi^2} \right)^{1/2} \quad (22)$$

wobei e die Elementarladung ist, ϵ_0 bzw. ϵ_r die Permittivität im Vakuum und die relative Permittivität, k die Boltzmannkonstante, T die Temperatur in Kelvin und N_A die Avogadrozahl. A besitzt den Wert $0,51 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$. Ein zusätzlicher Term erweitert den Gültigkeitsbereich des Debye-Hückel-Grenzgesetzes bis $I \leq 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$:

$$\lg y_{\pm} = -A z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + B \tilde{a} \sqrt{I}} \right) \quad (23)$$

Zur Berechnung der neu eingeführten Konstante $B\tilde{a}$ ist die Kenntnis des mittleren Ionenradius \tilde{a} notwendig, der nicht immer bekannt ist. Unter der Annahme eines sinnvollen Werts für Kaliumkationen und Chloridanionen von $\tilde{a} = 0,3 \text{ nm}$ ergibt sich für das Produkt $B\tilde{a}$ ungefähr der Wert $1 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ (und wird deshalb aus Praktikabilität oft aus der Gleichung gestrichen). B lässt sich im Rahmen der Debye-Hückel-Theorie wie folgt herleiten:

$$B = \left(\frac{2 N_A e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k T} \right)^{1/2} \quad (24)$$

In der Praxis kommen jedoch noch weit höhere Ionenstärken vor. Hier versagen einfache theoretische Beschreibungen. Davies hat daher in Anlehnung an das Debye-Hückel-Grenzgesetz eine halb-empirische Gleichung aufgestellt^[118]. Es gilt:

$$\lg y_{\pm} = -A z_i^2 \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + B \tilde{a} \sqrt{I}} - CI \right) \quad (25)$$

Der zusätzliche Parameter C ist ein empirisch anpassbarer Parameter. Ein typischer Wert, der für viele verschiedene Ionen Gültigkeit besitzt, ist $C = 0,3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ^[119,120]. Diese Gleichung gilt im Allgemeinen bis $I \leq 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Aktivitätskoeffizienten lassen sich durch elektrochemische Messungen relativ einfach bestimmen und werden für eine Vielzahl von Elektrolyten in der Literatur beschrieben. Oftmals werden jedoch statt der molaren Konzentration (c in $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) Molalitäten (b in $\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) angegeben. Molalitäten sind auf die Masse des Lösungsmittels bezogen und haben den Vorteil unabhängig von der Temperatur zu sein. Für die Umrechnung in Molaritäten ist allerdings die Kenntnis der Lösungsdichte ρ_L notwendig. Mit Gleichung

$$c = \frac{\rho_L b}{M b + 1} \quad (26)$$

lassen sich Konzentrationen in Molalitäten umrechnen. Dabei ist M die Molmasse des gelösten Elektrolyten. Literaturdaten für Molalitäten und die entsprechenden Dichten^[121] wurden an ein Polynom zweiten Grades angepasst ($\rho = \rho_2 b^2 + \rho_1 b + \rho_0$ mit $\rho_2 = -0,00175$, $\rho_1 = -0,04593$ und $\rho_0 = 0,9986$) und erlauben so die Umrechnung der Molalität in Molaritäten für beliebige Konzentrationen.

Abb. 22 zeigt die Aktivitätskoeffizienten von KCl für Ionenstärken bis zu $4 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Die Daten stammen aus zwei Publikationen von Hornibrook und Janz *et al.* (Quadrate)^[122] und Marques und Ferra *et al.* (Kreise)^[123]. Die zusätzlich eingezeichneten Kurven sind mit der Davies-Gleichung berechnet. Wird der übliche Parametersatz verwendet, kommt es zwischen Experiment und Berechnung ab einer Ionenstärke von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ zu deutlichen Abweichungen. Die Davies-Gleichung kann aber auch als Anpassungsfunktion verwendet werden. In diesem Fall wurde der Parameter A konstant gehalten und $B \tilde{a}$ und C durch numerische Anpassung neu bestimmt. Für das Produkt $B \tilde{a}$ wurde hierbei der theoretische Wert $1,08 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ ermittelt. Der durch Anpassung bestimmte Parameter C hingegen ist mit $0,037 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ um den Faktor 10 kleiner als der von Davies ursprünglich angenommene Wert. Durch diese Anpassung lässt sich die Davies Gleichung auch für KCl-Lösungen über einer Ionenstärke von $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ hinaus verwenden.

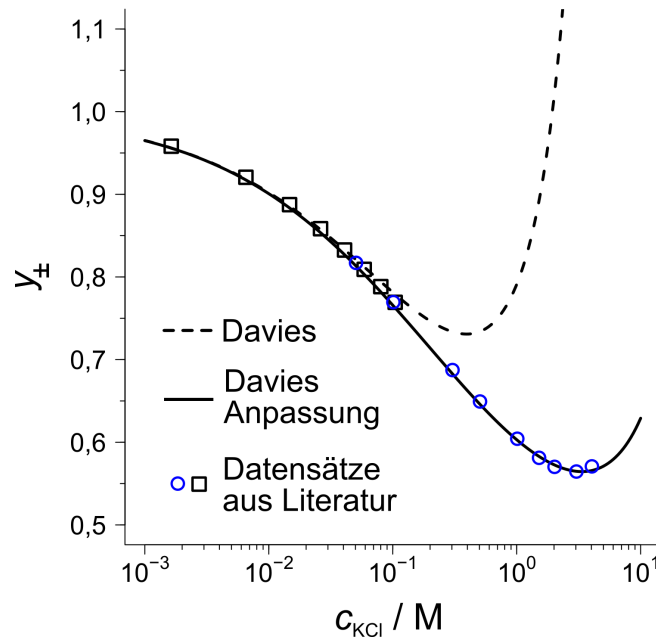


Abbildung 22: Aktivitätskoeffizienten (γ_{\pm}) für K^+ und Cl^- in Abhängigkeit von der Konzentration des Elektrolyten (c_{KCl}). Die Datenpunkte wurden zwei Publikationen entnommen und sind mit verschiedenen Symbolen (Quadrate^[122], blauer Kreise^[123]) gekennzeichnet. Die eingezeichneten Kurven wurden mithilfe der Davies-Gleichung berechnet. Die gestrichelte Kurve wurde mit dem bekannten Parametersatz von $A = 0,509 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$, $B\hat{a} = 1 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ und $C = 0,3 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ berechnet. Die durchgezogene Kurve entspricht einer numerischen Anpassung mit konstantem A und wählbaren Parametern $B\hat{a}$ und C ($A = 0,509 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$, $B\hat{a} = 1,18 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$, $C = 0,0273 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$).

Mithilfe der Davies-Gleichung und den neuen Parametern A , $B\hat{a}$ und C lassen sich die Potentiale der Ag/AgCl-Referenzelektroden berechnen. Tab. 5 gibt eine Übersicht über die gebräuchlichsten KCl-Konzentrationen und die sich dabei einstellenden Referenzpotentiale. Der Vergleich mit gemessenen Daten aus anderen Quellen^[112,124–127] zeigt eine hohe Übereinstimmung und beweist die Zuverlässigkeit der Berechnungsmethode. Die Abweichungen liegen deutlich unterhalb eines Prozentpunkts. Selbst für eine gesättigte Lösung (4,7 M) beträgt die Abweichung nur geringe 0,51 %.

Als Test für ein funktionierendes Messsystem mit 9WPtE-Elektrodenarraychips und unter Verwendung offener Ag/AgCl-Referenzelektroden wurde Ferri-/Ferrocyanid als Redoxsystem untersucht. Das Zellpotential oder auch Formalpotential wurde mithilfe einfacher zyklovol-tammetrischer Messungen in Dreielektrodenkonfiguration bestimmt. Dabei ergibt sich das Formalpotential als Mittelwert aus den beiden Peakpotentialen für Oxidation und Reduktion (siehe Formel 5).

Tabelle 5: Potentiale einer Ag/AgCl-Referenzelektrode ($e_{\text{Ag/AgCl}}^\circ$) für verschiedene KCl-Konzentrationen (c_{KCl}). Die experimentell bestimmten Potentiale stammen aus verschiedenen Literaturquellen^[112,124–127]. Die Potentiale gelten für 20 °C und ein Standardpotential von $e_{\text{Ag/AgCl}}^\circ = 222 \text{ mV}$ ^[128]. Für die Abweichungen der Berechnung vom Experiment wurden die experimentellen Daten als 100 % gesetzt.

$c_{\text{KCl}}/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	y_{\pm}	$a_{\text{KCl}}/\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$	$e_{\text{Ag/AgCl}}/\text{mV}$ berechnet	$e_{\text{Ag/AgCl}}/\text{mV}$ experimen- tell	Abweichung in %
0,10	0,766	0,08	287	288	- 0,35
1,00	0,603	0,60	235	236	- 0,43
3,00	0,565	1,69	209	210	- 0,48
3,50	0,565	1,98	205	205	0,00
4,65	0,569	2,64	198	197	+ 0,51

Für die Berechnung der Formalpotentiale wurde wieder von der Nernstschen Gleichung (Formel 2) ausgegangen. Für Ferri-/Ferrocyanid (FIII/FII) gilt:

$$e_{\text{F}} = e_{\text{F}}^\circ + \frac{2,303 \cdot RT}{F} \lg \frac{y_{\text{FIII}} c_{\text{FIII}}}{y_{\text{FII}} c_{\text{FII}}} \quad (27)$$

Hierbei ist e_{F}° das Standardpotential des Redoxsystems Ferri-/Ferrocyanid, c_{FIII} und y_{FIII} sind die Konzentration und der Aktivitätskoeffizient der Ferricyanidionen und c_{FII} und y_{FII} die Konzentration und der Aktivitätskoeffizient der Ferrocyanidionen. Unter Verwendung der Davies-Gleichung (Formel 25) zur Berechnung der Aktivitätskoeffizienten und unter Berücksichtigung, dass Ferri- und Ferrocyanid in gleichen Konzentrationen eingesetzt wurden, folgt für das Formalpotential:

$$e_{\text{F}} = e_{\text{F}}^\circ + \frac{2,303 \cdot RT}{F} Q (z_{\text{FII}}^2 - z_{\text{FIII}}^2) \quad \text{mit} \quad Q = A \left(\frac{\sqrt{I}}{1 + B \text{ \AA} \sqrt{I}} - CI \right) \quad (28)$$

Für die Ladungszahlen von Ferri- und Ferrocyanid gilt $z_{\text{FII}} = -4$ und $z_{\text{FIII}} = -3$. Alle anderen Größen entstammen der Nernstschen Gleichung (Formel 2) und der Davies-Gleichung (Formel 25). Die Parameter A , $B \text{ \AA}$ und C wurden für die Ferri- und Ferrocyanidionen neu angepasst, wobei A mit $0,509 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ wiederum konstant gehalten wurde und $B \text{ \AA}$ und C durch numerische Anpassung von Literaturwerten für Aktivitätskoeffizienten von Ferri-/Ferrocyanid^[129,130] neu bestimmt wurden ($B \text{ \AA} = 1,25 \text{ dm}^{3/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$, $C = 0,001 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$). Zusammen mit dem Wissen darüber, dass das messbare Zellpotential die Differenz der bei-

den Halbzellpotentiale ist (Formel 18) ließen sich dann die Zellpotentiale für unterschiedliche KCl-Konzentrationen berechnen und den gemessenen Potentialen gegenüberstellen. Als Standardpotentiale wurden $e_F^\circ = 0.361 \text{ V}^{[131]}$ und $e_{\text{Ag}/\text{AgCl}}^\circ = 0.222 \text{ V}^{[128]}$ verwendet. Da KCl in hohen Konzentrationen eingesetzt wurde, konnte der Beitrag des Kaliumhexacyanoferrats bei der Berechnung der Ionenstärke vernachlässigt werden.

Die gemessenen Zellpotentiale wurden durch die theoretisch berechnete Kurve sehr gut wiedergegeben (Abb. 23). Die Differenz zwischen Messwert und Berechnung betrug maximal 40 mV und wurde möglicherweise durch geringfügige Fehler in den Standardpotentialen verursacht. Die vorgestellten Methoden eignen sich demnach sehr gut zur Berechnung des Referenzpotentials der verwendeten Ag/AgCl-Referenzelektrode für verschiedene Ionenbedingungen.

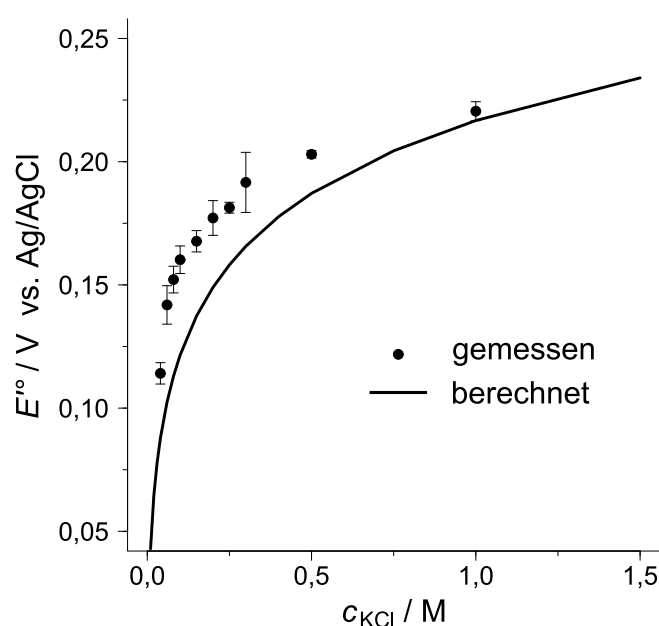


Abbildung 23: Zykelvoltammetrisch gemessene und berechnete Zellpotentiale (E'°) von Ferri-/Ferrocyanid (je 0.5 mM) gegen die Ag/AgCl-Referenz in Lösungen mit unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (c_{KCl}). Als Standardpotentiale für die Berechnungen wurden $e_F^\circ = 0.361 \text{ V}^{[131]}$ und $e_{\text{Ag}/\text{AgCl}}^\circ = 0.222 \text{ V}^{[128]}$ verwendet. Die gemessenen Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von neun Elektroden.

4.4.3 Empirische Bestimmung der optimalen Ferri-/Ferrocyanidkonzentration

4.4.3.1 Zykelvoltammetrie

Auch die für die zykelvoltammetrische Signalqualität optimale Redoxionenkonzentration wurde ermittelt. Dafür wurden CV-Messungen bei konstanter KCl-Konzentration von 0,1 M vor-

genommen, während die Ferri-/Ferrocyanidkonzentration (c_{FeCy}) von 0,1 bis 5 mM variiert wurde. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,05 und 0,35 V mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen.

Die aufgezeichneten Zyklovoltammogramme zeigten jeweils zwei Strompeaks für Oxidation und Reduktion von Ferri-/Ferrocyanid ($I_{\text{p,a}}$, $I_{\text{p,k}}$), die beide gleich groß waren, was auf eine reversible Redoxreaktion hindeutete (Abb. 24A). Die Höhe der Peakstromstärken nahm linear mit der Konzentration von Ferri-/Ferrocyanid zu (Abb. 24B). Dieser lineare Zusammenhang genügte der Randles-Sevcik-Gleichung (Formel 3), aus der für eine reversible Reaktion mit planarer Diffusion eine direkte Proportionalität zwischen der gemessenen Peakstromstärke und der Konzentration der Redoxsubstanz hervorgeht.

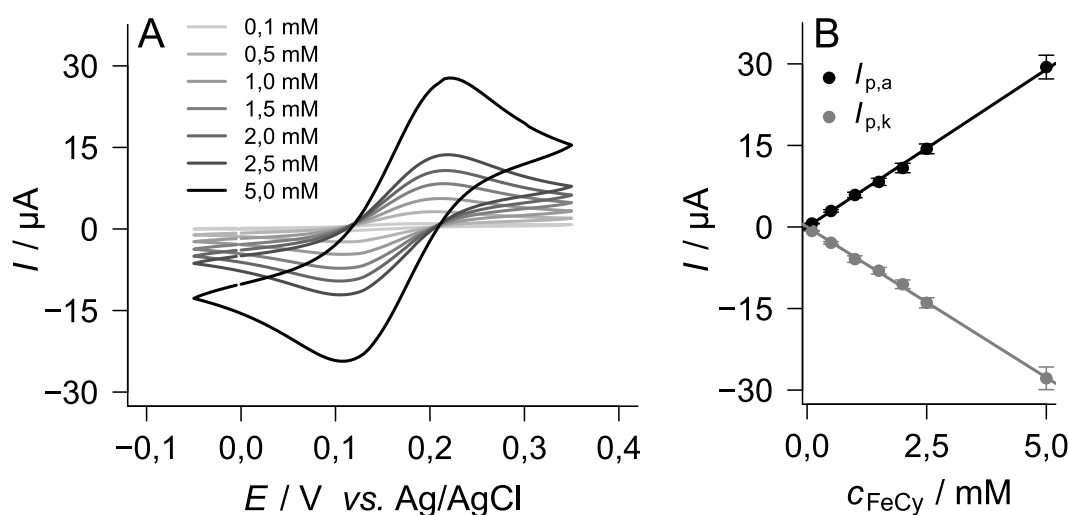


Abbildung 24: Zyklovoltammetrische Messungen für verschiedene Konzentrationen des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid (c_{FeCy}). A: Abgebildet sind Zyklovoltammogramme einer Elektrode für c_{FeCy} von 0,1 bis 5 mM bei 0,1 M KCl. Die Peakstromstärken ($I_{\text{p,a}}$, $I_{\text{p,k}}$) nahmen mit steigender Konzentration linear zu. Dies wird in B verdeutlicht, wo die Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von $I_{\text{p,a}}$ und $I_{\text{p,k}}$ für zwei Versuche mit mindestens sieben Elektroden gegen c_{FeCy} aufgetragen sind. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression betrug für $I_{\text{p,a}}$ und $I_{\text{p,k}}$ 0,999.

Das offene Zellpotential (arithmetisches Mittel aus den Peakpotentialen) änderte sich nicht signifikant mit der Erhöhung von c_{FeCy} . Dies lässt sich damit erklären, dass der Beitrag von Ferri-/Ferrocyanid zur Ionenstärke gering war. Das Leitsalz KCl wurde in mindestens zwanzigfach höherer Konzentration eingesetzt, wodurch es die Ionenstärke dominierte. Eine Änderung der Redoxionenkonzentration hatte demnach keine Auswirkungen auf das von der Ionenstärke abhängige formale Zellpotential. Wie auch schon bei der Bestimmung der optimalen KCl-Konzentration (4.4.1.1) wiesen die Daten für das Zellpotential nur geringe

Standardabweichungen von 2-5 % auf, was für ein stabiles Referenzsystem sprach.

Die Separation der beiden Peaks hingegen stieg mit Erhöhung der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration von 0,1 bis 1,5 mM an, zeigte dann aber keine weitere Zunahme, trotz Erhöhung von c_{FeCy} auf bis zu 5 mM (Tab. 6). Die Zunahme lässt auf einen quasi-reversiblen Reaktionsmechanismus schließen. Bei Anwesenheit von mehr Ferri-/Ferrocyanid im Elektrolyten sinkt die Konzentration der jeweiligen Redoxspezies direkt an der Elektrode durch einen gehemmten Umsatz erst bei höheren Spannungen.

Die CV-Messungen zeigten im gewählten Konzentrationsbereich für Ferri-/Ferrocyanid ein stabiles Referenzpotential. Um eine optimale Signalqualität zu gewährleisten, wurde die minimale c_{FeCy} mit 1 mM festgelegt.

Tabelle 6: CV-Parameter $I_{\text{p,a}}$, $I_{\text{p,k}}$, E'° (vs. Ag/AgCl) und ΔE_{p} als Funktion der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration (c_{FeCy}). Alle Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens sieben Elektroden bei einer KCl-Konzentration von 0,1 M.

$c_{\text{FeCy}}/\text{mM}$	$I_{\text{p,a}}/\mu\text{A}$	$I_{\text{p,k}}/\mu\text{A}$	E'°/mV	$\Delta E_{\text{p}}/\text{mV}$
0,1	$0,64 \pm 0,06$	$-0,73 \pm 0,08$	148 ± 3	79 ± 4
0,5	$2,95 \pm 0,24$	$-2,91 \pm 0,23$	151 ± 3	95 ± 8
1,0	$5,89 \pm 0,51$	$-5,91 \pm 0,60$	146 ± 7	94 ± 12
1,5	$8,29 \pm 0,65$	$-8,05 \pm 0,61$	151 ± 4	114 ± 5
2,0	$10,85 \pm 0,87$	$-10,54 \pm 0,79$	153 ± 3	115 ± 4
2,5	$14,37 \pm 0,90$	$-13,95 \pm 0,93$	148 ± 7	106 ± 12
5,0	$29,41 \pm 2,18$	$-27,84 \pm 2,08$	152 ± 7	112 ± 10

4.4.3.2 Impedanzspektroskopie

Zusätzlich zu den zykelvoltammetrischen Messungen wurden auch Impedanzmessungen mit einer Ferri-/Ferrocyanidkonzentrationsreihe von 0,1 bis 5 mM durchgeführt (ebenfalls mit 0,1 M KCl), um eine optimale Redoxionenkonzentration (c_{FeCy}) zu bestimmen. Dafür wurde eine Wechsellspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential angelegt und die Impedanz für Frequenzen von 1 Hz bis 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) gemessen.

Die Nyquistplots zeigten bei Erhöhung von (c_{FeCy}) eine Verringerung des Durchmessers des typischen Halbkreises, den die Daten beschrieben (Abb. 25). Dies bedeutete eine Verringerung des Ladungstransferwiderstands R_{ct} . Eine numerische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe eines abgewandelten Randles-Modells^[80] vorgenommen ($((R_{\text{ct}} - Z_{\text{W}})||\text{CPE}) - R_{\text{s}}$). Dabei wurde der Gesamtbetrag der Impedanz in die Einzelanteile des Ersatzschaltbildes zerlegt. Die Änderungen der so bestimmten Impedanzparameter sind in Abb. 26 dargestellt, ebenso wie das zur Auswertung verwendete Ersatzschaltbild. Die numerische Auswertung bestätigte die in den Nyquistplots beobachtete Abnahme des Ladungstransferwiderstands mit steigender c_{FeCy} .

Es wurde ein indirekt linearer Zusammenhang beobachtet (Bestimmtheitsmaß $r_p^2 = 0,998$), der sich damit erklären lässt, dass eine größere Konzentration von Ferri-/Ferrocyanidionen in der Messlösung auch eine größere Konzentration der Redoxionen an der Elektrode bewirkte und somit der Widerstand für die Elektronenübertragung geringer war.

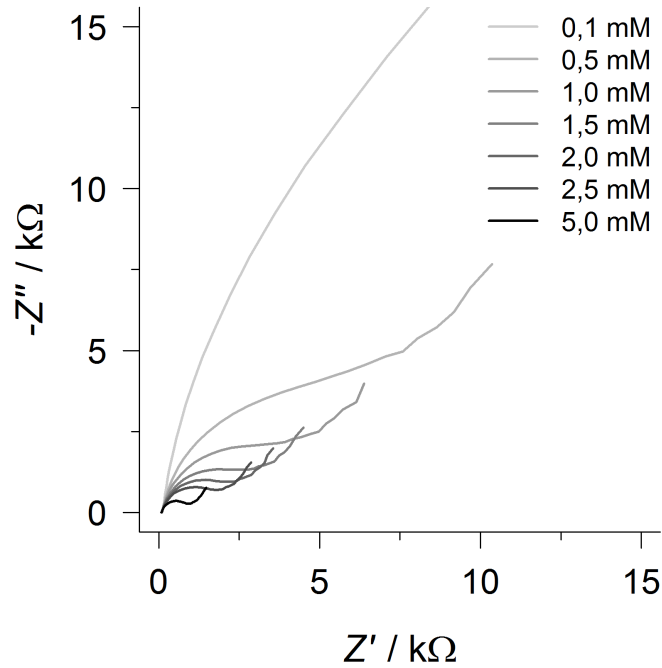


Abbildung 25: Nyquistplots für verschiedene Konzentrationen des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid (c_{FeCy}). Die Nyquistplots zeigten eine deutliche Verkleinerung des typischen Halbkreises bei Erhöhung der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration (c_{FeCy}) von 0,1 bis 5 mM. Die abgebildeten Plots sind Rohdaten einer Elektrode bei einer Leitsalzkonzentration von 0,1 M KCl.

Auch für den Warburgkoeffizienten wurde ein indirekt linearer Zusammenhang mit c_{FeCy} bestimmt ($r_p^2 = 0,9999$). Durch eine erhöhte Ferri-/Ferrocyanidkonzentration in der Messlösung erhöhte sich auch die Konzentration der Redoxionen in der Diffusionsschicht, die durch die Warburgimpedanz modelliert wird. Der Warburgkoeffizient ist definiert als

$$\sigma = \frac{RT}{z^2 F^2 A_E \sqrt{2}} \left(\frac{1}{\sqrt{D_O} c_O} + \frac{1}{\sqrt{D_R} c_R} \right) \quad (29)$$

mit R als universeller Gaskonstante, T als Temperatur in Kelvin, z als Anzahl der Elektronen, die bei der Reaktion übertragen werden, F als Faradaykonstante, A_E als Elektrodenfläche und

D_O und D_R sowie c_O und c_R als die Diffusionskoeffizienten und Konzentrationen der oxidierten und reduzierten Spezies. Mit der aus Formel 29 hervorgehenden indirekten Proportionalität zwischen σ und der Redoxionenkonzentration erklärt sich die experimentell beobachtete lineare Abnahme des Warburgkoeffizienten mit steigender c_{FeCy} .

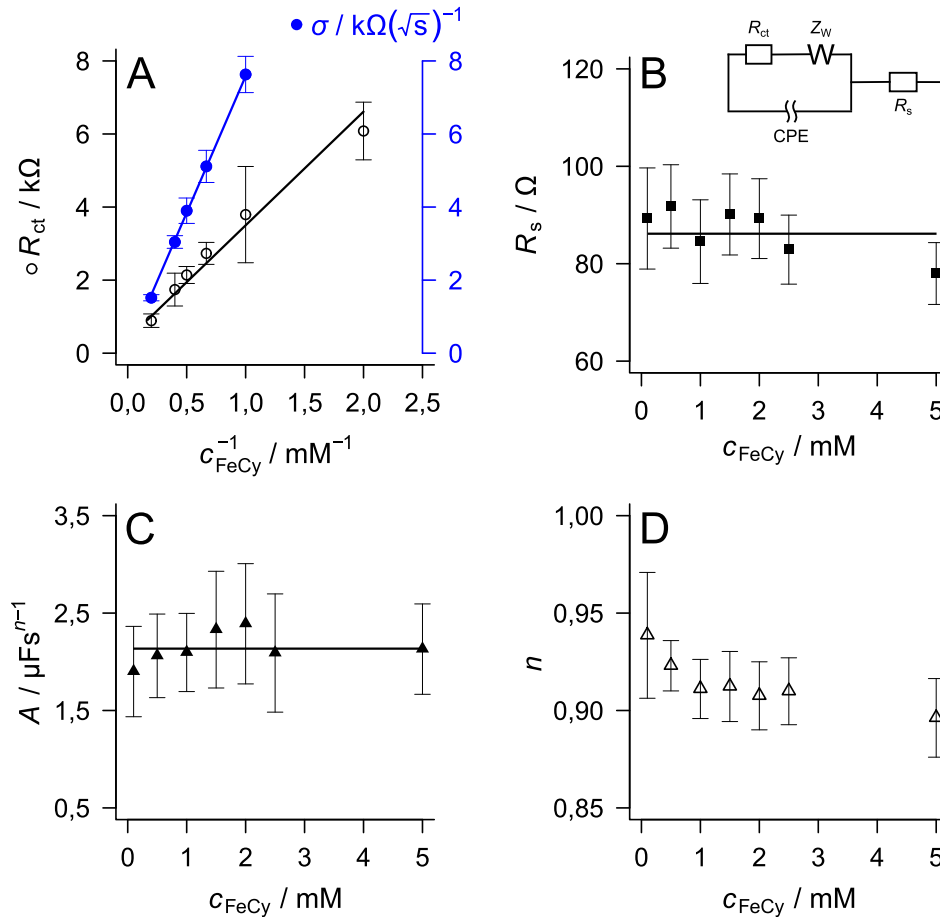


Abbildung 26: Impedanzparameter σ , R_{ct} , R_s , A und n als Funktion der Konzentration des Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid (c_{FeCy}). Alle Datenpunkte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens sieben Elektroden bei einer KCl-Konzentration von 0,1 M. **A:** R_{ct} und σ (gefüllter Kreis) stiegen linear mit abnehmender Ferri-/Ferrocyanidkonzentration. Das Bestimmtheitsmaß r_p^2 der linearen Regression betrug für R_{ct} 0,998 und für σ 0,9999. **B:** Der Lösungswiderstand R_s änderte sich nicht signifikant mit Erhöhung von c_{FeCy} (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]). **C:** Der CPE Parameter A zeigte keine signifikante Änderung bei Variation von c_{FeCy} . **D:** Der Parameter n nahm mit c_{FeCy} ab. Jedoch betrug die Abnahme zwischen 0,1 und 5 mM lediglich ca. 0,05.

Der Lösungswiderstand hingegen änderte sich nicht mit Zunahme der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration. Die Erhöhung der Redoxionenkonzentration hatte einen vernachlässig-

baren Einfluss auf die Ionenstärke und somit auch auf den Widerstand des Elektrolyten, da das Leitsalz KCl in einer weit höheren Konzentration von 0,1 M eingesetzt wurde.

Auf den Impedanzanteil des konstanten Phasenelements (CPE) hatte die Erhöhung von c_{FeCy} ebenfalls kaum Einfluss. Der Parameter A , der vergleichbar mit der Kapazität eines Kondensators ist, zeigte keine signifikante Änderung mit Zunahme der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration. Der Parameter n des CPE zeigte zwar eine signifikante, jedoch nur geringfügige Abnahme von $0,94 \pm 0,03$ auf $0,90 \pm 0,02$ mit der Zunahme der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration von 0,1 auf 5 mM (Tab. 7). Da durch die Erhöhung von c_{FeCy} die Dicke des Dielektrikums nicht verändert wurde, zeigte sich auch keine Änderung der kapazitiven Eigenschaften der Elektrode, ergo der CPE-Parameter.

Tabelle 7: Impedanzparameter R_{ct} , σ , R_s , A und n als Funktion der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration (c_{FeCy}). Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens sieben Elektroden bei einer KCl-Konzentration von 0,1 M.

c_{FeCy}/M	$R_{\text{ct}}/\text{k}\Omega$	$\sigma/\text{k}\Omega(\sqrt{\text{s}})^{-1}$	R_s/Ω	$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	n
0,1	$24,73 \pm 6,30$	$71,73 \pm 7,07$	89 ± 10	$1,90 \pm 0,46$	$0,94 \pm 0,03$
0,5	$6,08 \pm 0,79$	$14,86 \pm 1,35$	92 ± 9	$2,06 \pm 0,43$	$0,92 \pm 0,01$
1,0	$3,79 \pm 1,32$	$7,63 \pm 0,50$	85 ± 9	$2,10 \pm 0,40$	$0,91 \pm 0,02$
1,5	$2,73 \pm 0,30$	$5,11 \pm 0,44$	90 ± 8	$2,33 \pm 0,60$	$0,91 \pm 0,02$
2,0	$2,14 \pm 0,23$	$3,90 \pm 0,35$	89 ± 8	$2,39 \pm 0,62$	$0,91 \pm 0,02$
2,5	$1,74 \pm 0,45$	$3,04 \pm 0,17$	83 ± 7	$2,09 \pm 0,61$	$0,91 \pm 0,02$
5,0	$0,89 \pm 0,19$	$1,52 \pm 0,08$	78 ± 6	$2,13 \pm 0,46$	$0,90 \pm 0,02$

Die Impedanzmessungen zeigten eine Abhängigkeit von R_{ct} und σ von der Ferri-/Ferrocyanidkonzentration. Diese beiden Parameter repräsentieren die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid an der Arbeitselektrode, R_{ct} als Widerstand für den Ladungstransfer und σ als Diffusionsabhängigkeit der Reaktion. Um Änderungen dieser beiden Parametern durch die biologische Funktionalisierung der Elektroden oder die biosensorische Detektion von Analyten nachweisen zu können, müssen ihre Ausgangswerte für eine saubere Elektrode möglichst gering gehalten werden. Daher wurde auch für die Impedanzmessungen eine minimal einzusetzende Konzentration von 1 mM Ferri-/Ferrocyanid festgelegt.

Abschließend lässt sich zur Charakterisierung des Referenzsystems festhalten, dass die hergestellten Ag/AgCl-Elektroden im gewählten Konzentrationsbereich des Elektrolyten eine hohe Stabilität zeigten. Das mit ihnen gemessene Zellpotential war reproduzierbar, sowohl zwischen unabhängigen Experimenten, als auch zwischen verschiedenen Referenzelektroden.

Außerdem konnte eine geeignete Berechnungsmethode für das Referenzpotential der verwendeten Ag/AgCl-Elektroden aufgestellt werden, die es erlaubt das Potential für verschiedene Ionenkonzentrationen theoretisch zu bestimmen. Für KCl und Ferri-/Ferrocyanid wurden geeignete Konzentrationsgrenzen bestimmt, um ausreichende impedimetrische und zykovoltammetrische Signalqualität zu gewährleisten. Für KCl betrug diese Grenze 0,1 M und für Ferri-/Ferrocyanid 1 mM.

4.5 Charakterisierung der 9WPtE-Elektrodenarraychips

4.5.1 Optimierung der Fertigungsprozesse

Die Fertigungsprozesse für die 9WPtE-Elektrodenarraychips wurden hinsichtlich der elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden optimiert. So wurden zwei Sputterverfahren (Gleich- und Wechselstrommagnetron Sputtern) für das Aufbringen der Metallschichten und zwei verschiedene Haftvermittler (Chrom und Indiumzinnoxid) getestet. Die Schichtdicke der Elektroden wurde mikroskopisch bestimmt, um deren Einfluss auf die Impedanzmessung zu untersuchen. Außerdem wurde überprüft, ob auf die übliche Isolierungsschicht für die Leiterbahnen zu Gunsten der Recyclebarkeit der Elektroden verzichtet werden kann.

4.5.1.1 Wahl des optimalen Sputterverfahrens zum Aufbringen der Metallschichten

Die Strukturen des Elektrodenarraychips wurden durch Sputtern (Kathodenzerstäubung) auf einen Borosilikatchip aufgebracht. Gold wurde als Material für die Elektroden, Leiterbahnen und Kontaktpads genutzt, wobei ca. 500 nm aufgetragen wurden. Für die Gegenelektroden wurde auf Gold eine zusätzliche ca. 50 nm dicke Schicht Platin aufgetragen. Da Gold alleine keine stabile Haftung auf dem Borosilikatsubstrat zeigte, wurde vorher eine ca. 50 nm dicke Haftvermittlerschicht aus Indiumzinnoxid oder Chrom auf das Substrat aufgebracht. Um die Metallstrukturen aufzubringen, wurden zwei Sputterverfahren auf ihre Eignung geprüft: das Gleichstrom- (DC) und das Hochfrequenzwechselstromsputtern (HF). Beim Sputtern wird zwischen dem Substrat und dem aufzubringenden Material (z. B. Gold), dem sogenannten *Target*, ein elektrisches Feld angelegt. Dabei befinden sich Substrat und *Target* in einer Vakuumkammer, in die ein Edelgas (meist Argon) eingeführt wird. Durch Gasentladung entstehen Edelgasionen, die Atome aus dem *Target* schlagen, welche sich dann auf dem Substrat abscheiden. Beim DC-Sputtern wird Gleichstrom zwischen dem Substrat und dem *Target* angelegt, wobei das Substrat als Anode gepolt wird und das *Target* als Kathode, daher auch die Bezeichnung Kathodenzerstäubung. Beim HF-Sputtern hingegen wird ein hochfrequentes Wechselstromfeld angelegt. In diesem Wechselstromfeld kommt es zu vermehrten Zusammenstößen zwischen Elektronen und Edelgasatomen. Dadurch wird die Ionisierung erhöht und in Folge dessen kann bei kleineren Drücken gearbeitet werden, was dünnere Schichten auf dem

Substrat mit anderen Gefügestrukturen ermöglicht. Um die positiven Ionen auf das *Target* zu lenken ist zwischen diesem und z. B. der Druckkammerwand zusätzlich eine Gleichspannung angelegt, bei der das *Target* den negativen Pol bildet. In der Arbeit wurde bei beiden Betriebsarten zusätzlich ein Dauermagnetfeld aufgebaut, welches das elektrische Feld überlagerte (Magnetronspattern). Dies bewirkt eine Erhöhung der Abscheiderate auf dem Substrat.

Als Kriterien für die Auswahl des optimalen Sputterverfahrens, DC oder HF, dienten die Oberflächenbeschaffenheit der Arbeitselektroden und die elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden. Verglichen wurden Elektrodenarraychips ohne SU8-Isolierungsschicht und mit Indiumzinnoxid als Haftvermittler.

Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Oberflächentopographie Für die Funktionalisierung der Goldarbeitselektroden des Chips zum Aufbau von Biosensoren war eine glatte Elektrodenoberfläche nötig, da Unebenheiten die Stabilität der funktionellen Biosensorschichten verringern würden. Mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, *Atomic Force Microscopy*) wurde daher die Oberflächentopographie der mit HF und DC gesputterten Goldarbeitselektroden untersucht.

Bei der Rasterkraftmikroskopie wird als Messfühler ein sogenannter *Cantilever* (Messnadel) benutzt. Dieser besteht z. B. aus Silizium oder Siliziumnitrid. An seinem Ende befindet sich eine scharfe Spitze mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern (am Apex). Diese Spitze wird über die Probe gefahren und die Kräfte zwischen der Spitze und der Probenoberfläche bewirken ein verbiegen der Messnadel. Die Biegung kann durch Detektoren aufgezeichnet werden (meist optisch durch Laser). Aus der Biegung der Messnadel kann dann die Oberflächentopographie der abgefahrenen Probe errechnet werden. Die AFM-Aufnahme kann entweder wie schon beschrieben mit konstanter Höhe des Messkopfes durchgeführt werden. Dann wird die Oberflächentopographie aus der Veränderung der Biegung der Messnadel berechnet. Oder es wird in einem Modus aufgenommen, bei dem die Kraft konstant gehalten wird. Dann errechnet sich das Bild aus der Bewegung des Messkopfes in z-Richtung. Neben diesen grundlegenden Betriebsarten des AFM gibt es eine ganze Reihe von Messmodi, um unterschiedlichsten Probenbeschaffenheiten gerecht zu werden.

Die Untersuchung der Oberflächen der Arbeitselektroden mittels AFM wurde mit dem *Bioscope Catalyst* von Bruker AXS in Luft durchgeführt. Dazu wurde ein Siliziumnitrid-*Cantilever* mit einem Spitzenradius von 2 nm und einer Federkonstante von 0,4 N/m verwendet. Es wurde im *ScanAsyst*-Modus basierend auf dem *Peak-Force-Tapping*-Modus von Bruker AXS gearbeitet. Die genaue Durchführung der Experimente ist in 3.4 beschrieben.

AFM-Aufnahmen von Oberflächen der mit DC und HF gesputterten Goldarbeitselektroden sind in Abb. 27 zu sehen. Die Aufnahmen zeigten für beide Sputterverfahren eine körnige Oberflächentopographie mit gleicher Korngröße zwischen 30-60 nm. Jedoch wiesen die

Oberflächen der mit DC gesputterten Arbeitselektroden wesentlich größere Höhenunterschiede auf. Eine Rauigkeitsanalyse (siehe 3.4) ergab für DC-Sputtern eine mittlere Rauigkeit r_a von $3,8 \pm 0,6$ nm und für HF-Sputtern lediglich $1,9 \pm 0,4$ nm (je drei unabhängige Messungen).

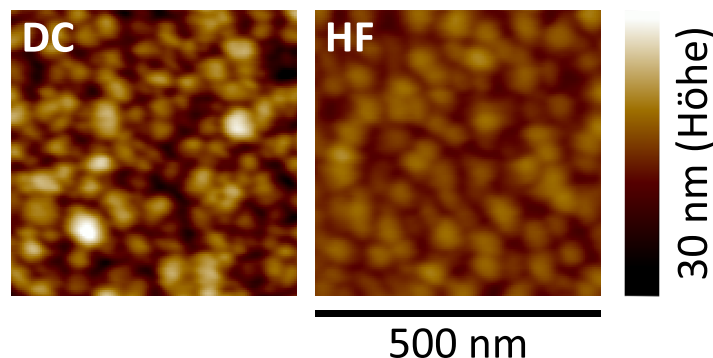


Abbildung 27: Oberflächentopographien der Arbeitselektroden nach DC- und HF-Sputtern. Die AFM-Aufnahmen wurden durch Glättung zweiter Ordnung und einen Tiefpassfilter der *NanoScope*-Analysesoftware bearbeitet. Beide Sputterverfahren ergaben eine körnige Oberflächentopographie (Korngröße 30-60 nm). Beim DC-Sputtern waren die Höhenunterschiede auf der Elektrodenoberfläche größer als beim HF-Sputtern (Farbskala und Maßstab gelten für beide Aufnahmen).

Zyklovoltammetrie Die elektrochemischen Eigenschaften der mit DC und HF gesputterten Arbeitselektroden wurden zykvoltammetrisch untersucht. CV-Messungen wurden in 0,1 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid durchgeführt. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,05 und 0,35 V mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Sputterverfahren bezüglich der CV-Parameter nachgewiesen werden. Die Peakstromstärken für Oxidation und Reduktion betrugen für DC und für HF ca. 30 μ F. Die Peakseparation lag für beide bei ca. 100 mV und das offene Zellpotential bei ca. 150 mV.

Impedanzspektroskopie Die durch DC- und HF-Sputtern hergestellten Arbeitselektroden wurden auch impedimetrisch auf Unterschiede geprüft. Impedanzspektren wurden zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 0,1 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen. Die Daten wurden numerisch mit Hilfe des abgewandelten Randles-Modells^[80] bestehend aus Ladungstransferwiderstand R_{ct} , Warburgimpedanz Z_W , konstantem Phasenelement (CPE) und Lösungsmittelwiderstand R_s ($((R_{ct} - Z_W) || CPE) - R_s$) ausgewertet.

Die durch DC- und HF-Sputtern hergestellten Elektroden unterschieden sich nur im CPE-Parameter A . Dieser betrug für DC-Sputtern $2,5 \pm 0,9 \mu\text{Fs}^{n-1}$ und für HF-Sputtern $2,2 \pm 0,5 \mu\text{Fs}^{n-1}$. Durch Korrelation der Daten mit den AFM-Rauigkeitsanalysen kann der

kleinere Wert für A im HF-Modus erklärt werden. Eine kleinere Rauigkeit der Elektroden lässt auf eine kleinere effektive Oberfläche dieser Elektroden schließen. Eine kleinere Oberfläche hat wiederum Einfluss auf die Kondensatoreigenschaften der Ionendoppelschicht an der Elektrode. Mit sinkender Fläche sinkt auch die Kapazität bzw. der Parameter A des CPE (siehe Formel 16), was anhand der numerischen Auswertung der Impedanzdaten bestätigt werden konnte. Dieser Unterschied war zwar gering, bestätigte aber die mit dem AFM beobachtete erhöhte Rauigkeit der Elektroden, die mit DC gesputtert waren. Der Unterschied im Parameter n des CPE zwischen DC ($0,89 \pm 0,03$) und HF ($0,90 \pm 0,02$) war vernachlässigbar gering. Auch die Impedanzparameter R_s (ca. 75Ω), R_{ct} (ca. 400Ω) und σ (ca. 1400Ω) unterschieden sich nicht signifikant zwischen mit DC und HF gesputterten Elektroden.

Der Vergleich der Elektrodenarrays, die mit DC- oder HF-Sputterverfahren hergestellt worden waren, ergab einen Unterschied in der Rauigkeit der Oberfläche. Nach DC-Sputtern waren die Oberflächen doppelt so rau, wie die Oberflächen nach HF-Sputtern. Zykelvoltammetrisch konnte zwar kein Unterschied zwischen den Sputterverfahren beobachtet werden, aber impedimetrisch resultierte die höhere Rauigkeit der mit DC gesputterten Elektrodenoberflächen in einem geringfügig erhöhten Wert für den CPE-Parameter A (um ca. $0,3 \mu\text{Fs}^{n-1}$). Zur weiteren Funktionalisierung der Goldarbeits Elektroden für biosensorische Anwendungen war eine möglichst glatte Elektrodenoberfläche nötig, da Unebenheiten die Stabilität der biologischen Erkennungsschichten verringern würden. Deswegen wurden für den Aufbau von Biosensoren nur Elektrodenarrays eingesetzt, die durch HF-Sputtern hergestellt worden waren.

4.5.1.2 Wahl des optimalen Haftvermittlers für die Chipfertigung

Da Gold alleine keine stabile Haftung auf dem Borosilikatsubstrat zeigte, konnte das Metall für die Elektroden nicht direkt aufgetragen werden. Vorher wurde eine Haftvermittlerschicht aufgebracht. Dazu wurden zwei Materialien getestet: Chrom (Cr) als ein oft verwendeter Haftvermittler und Indiumzinnoxid (ITO). Als Auswahlkriterien dienten die Stabilität der Metallschichten auf dem Substrat, die Oberflächenbeschaffenheit der Arbeitselektroden und die elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden. Verglichen wurden Elektrodenarraychips, die durch HF-Magnetronsputtern und mit SU8-Isolierung hergestellt worden waren.

Stabilität der Metallschichten der Elektrodenarraychips Nach der Fertigung zeigten sowohl die Elektrodenarraychips mit ITO als auch die mit Cr eine stabile Haftung der Metallstrukturen. Sie wurde weder durch Behandlung mit den wässrigen Lösungen für die elektrochemischen Messungen, noch durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln wie Ethanol beeinträchtigt. Mehrmaliges Verwenden der Chips für den Aufbau von Biosensoren immer gefolgt von Recyclingschritten (nach 3.10) zeigte jedoch Unterschiede zwischen den Haftver-

mittlern. Während bei den Chips mit ITO als Haftvermittler auch nach dem zwanzigsten Einsatz kein Ablösen der Metallstrukturen beobachtet wurde, wiesen die auf Cr basierenden Elektrodenarrays schon nach wenigen Nutzungen (maximal drei) Schäden der Strukturen auf. Die Goldschicht der Arbeits- und Gegenelektroden löste sich von der Chromschicht, was die Elektroden unbrauchbar machte. Außerdem zeigten die Kontaktpads starke Abnutzungen an den Stellen, wo die Federkontaktstifte des Adapters auf die Pads trafen, wodurch die Kontaktierung der Elektroden nicht mehr möglich war. In Abb. 28 sind beispielhaft Elektroden bzw. Kontaktpads von Chips mit Chrom (Abb. 28A,B,C) oder ITO (Abb. 28D,E,F) als Haftvermittler abgebildet, um die qualitativen Unterschiede zu verdeutlichen. Die geringe Haftung der Goldschicht auf der Chromschicht beruhte möglicherweise auf der Oxidierung der Chromoberfläche während der Fertigung der Elektrodenarraychips.

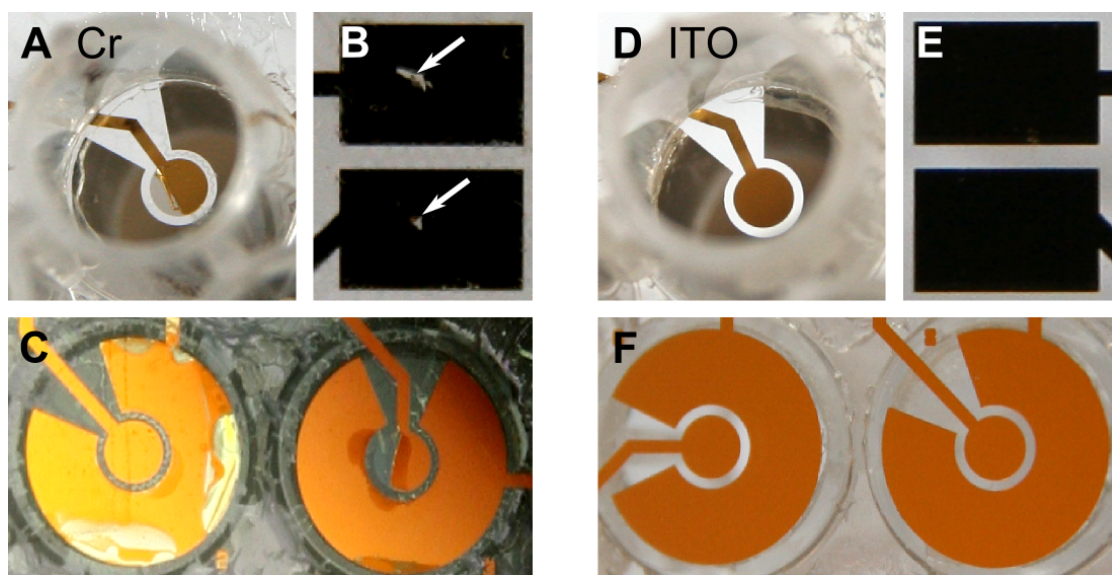


Abbildung 28: Stabilität der Metallschichten der Elektrodenarraychips in Abhängigkeit von der Haftvermittlerschicht. Die Photos **A** bis **C** zeigen die Metallstrukturen eines 9WPtE-Chips mit Cr als Haftvermittler. Die Au- und Pt-Au-Schichten der Elektroden lösten sich vom Chrom bereits nach maximal drei Nutzungen. Die Kontaktpads zeigten an den Stellen, wo die Federkontaktstifte des Adapters auf die Pads trafen, starke Abnutzungen. **D** bis **F** zeigen Strukturen eines Chips mit ITO als Haftvermittler. Auch nach bis zu 20 Nutzungen lösten sich die Au- und Pt-Au-Schichten nicht vom ITO und es traten kaum Abnutzungserscheinungen an den Kontaktpads auf.

Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Oberflächentopographie Die Untersuchung der Oberflächen der auf Cr oder ITO basierenden Arbeitselektroden mittels AFM wurde mit dem *Bioscope Catalyst* von Bruker AXS in Luft durchgeführt. Dazu wurde ein Siliziumnitrid-*Cantilever* mit einem Spitzenradius von 2 nm und einer Federkonstante von 0,4 N/m ver-

wendet. Es wurde im *ScanAsyst*-Modus basierend auf dem *Peak-Force-Tapping*-Modus von Bruker AXS gearbeitet. Die genaue Durchführung der Experimente ist in 3.4 beschrieben.

In Abb. 29 sind AFM-Aufnahmen von Oberflächen der Haftvermittler Cr und ITO auf Borosilikat zu sehen (50 nm Schichten). Die Oberflächentopographien zeigten Unterschiede in der Strukturierung. Die Chromoberflächen waren körnig mit Korngrößen von 20-40 nm. Die ITO-Oberflächen hingegen zeigten keine Körnung. Die Aufnahmen wurden einer Rauigkeitsanalyse (siehe 3.4) unterzogen, bei der sich für Cr eine mittlere Rauigkeit r_a von $0,75 \pm 0,04$ nm ergab und für ITO $0,47 \pm 0,06$ nm. Die ca. 50 nm dicken ITO-Schichten zeigten also eine signifikant niedrigere Rauigkeit als die Chromschichten.

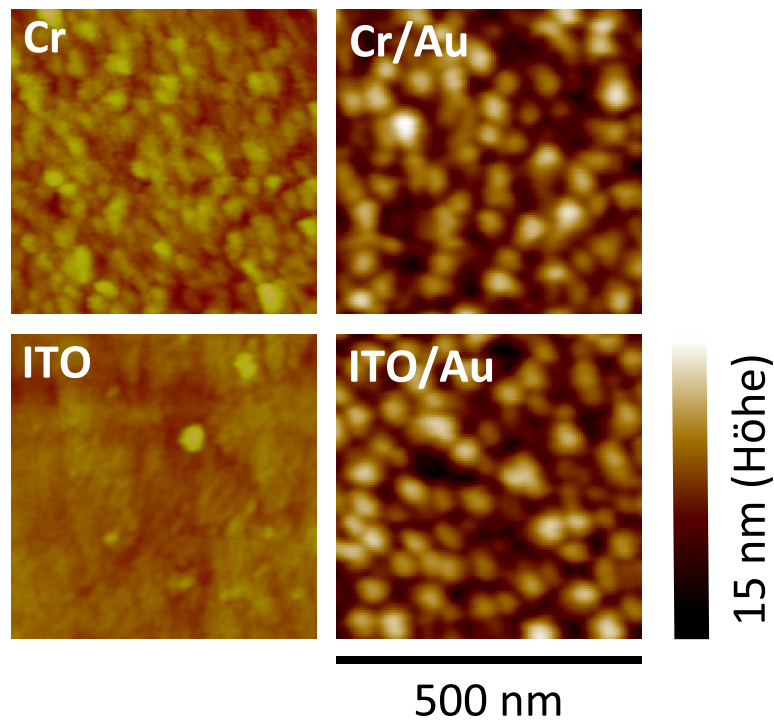


Abbildung 29: Oberflächentopographien der Haftvermittlerschichten und Arbeitselektroden. Die AFM-Aufnahmen wurden durch Glättung zweiter Ordnung und einen Tiefpassfilter der *NanoScope*-Analysesoftware bearbeitet. Die Oberfläche des Haftvermittlers Cr war im Vergleich zu ITO rauer und zeigte eine körnige Struktur. Die Oberflächentopographien der Goldarbeitselektroden mit Cr (Cr/Au) und ITO (ITO/Au) als Haftvermittler waren hingegen identisch (Farbskala und Maßstab gelten für alle vier Aufnahmen).

Es wurden daraufhin auch AFM-Aufnahmen von den Goldoberflächen der Arbeitselektroden (ca. 500 nm) mit Cr oder ITO als Haftvermittler (ca. 50 nm) aufgenommen. In Abb. 29 sind auch Aufnahmen dieser Oberflächen zu sehen. Die Oberflächentopographien waren iden-

tisch. Sowohl mit Cr als auch mit ITO als Haftvermittler zeigte die Goldoberfläche eine körnige Struktur mit Korngrößen von 30-50 nm. Die Rauigkeitsanalyse ergab für beide Oberflächen eine mittlere Rauigkeit von $1,9 \pm 0,4$ nm. Die Oberflächenunterschiede der Cr- und ITO-Haftvermittlerschichten wurden demnach von der ca. zehnfach dickeren Goldschicht kompensiert.

Zyklovoltammetrie Die elektrochemischen Eigenschaften der Arbeitselektroden von Elektrodenarraychips mit den Haftvermittlern Cr und ITO wurden zykvoltammetrisch untersucht. CV-Messungen wurden in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyanid durchgeführt. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,05 und 0,35 V mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Haftvermittlern Cr und ITO bezüglich der CV-Parameter nachgewiesen werden. Die Peakstromstärken für Oxidation und Reduktion betrugen für ITO und Cr ca. $4,4 \mu\text{F}$. Die Peakseparation lag für beide bei ca. 85 mV und das offene Zellpotential bei ca. 140 mV.

Impedanzspektroskopie Die Arbeitselektroden mit Cr und ITO als Haftvermittler wurden auch impedimetrisch auf Unterschiede getestet. Impedanzspektren wurden zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyanid bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen. Die Daten wurden numerisch mit Hilfe des abgewandelten Randles-Modells^[80] bestehend aus Ladungstransferwiderstand R_{ct} , Warburgimpedanz Z_{W} , konstantem Phasenelement (CPE) und Lösungsmittelwiderstand R_{s} ($((R_{\text{ct}} - Z_{\text{W}}) || \text{CPE}) - R_{\text{s}}$) ausgewertet. Die auf Cr und ITO basierenden Elektroden unterschieden sich nur im Parameter R_{ct} voneinander. Dieser war für Cr mit $2,6 \pm 1,4 \text{ k}\Omega$ größer als für ITO mit $1,4 \pm 0,3 \text{ k}\Omega$. Vermutlich beruhte dieser Unterschied weniger auf einer direkten Beeinflussung des Ladungstransfers durch den Haftvermittler, als darauf, dass die Haftung zwischen ITO und Gold besser war als zwischen Chrom und Gold. Somit war möglicherweise die Leitfähigkeit der Elektroden und Leiterbahnen mit Chrom-Haftvermittlerschicht gegenüber den auf ITO basierenden Strukturen verringert. Die Impedanzparameter R_{s} (ca. 110Ω), A (ca. $1,5 \pm 0,5 \mu\text{Fs}^{n-1}$), n (ca. 0,9) und σ (ca. $10,5 \text{ k}\Omega$) unterschieden sich nicht signifikant zwischen Elektroden, die mit DC oder HF gesputtert worden waren.

Die Unterschiede zwischen Elektrodenarraychips mit Cr und solchen mit ITO als Haftvermittler waren, was die elektrochemischen Eigenschaften und die Oberflächentopographie betraf, vernachlässigbar. Jedoch waren die auf Cr basierenden Strukturen wesentlich instabiler. Die Arrays auf Cr-Basis waren maximal für drei Anwendungen einsetzbar, dann löste sich

die Goldschicht vom Chrom. Daher wurden für den Aufbau von Biosensoren nur Elektrodenarraychips auf ITO-Basis eingesetzt.

4.5.1.3 Einsatz des Isolierungslacks SU8

Um definierte Elektodenflächen zu realisieren, wurde eine Isolierungsschicht aus SU8-Lack auf den gesamten Array, mit Ausnahme der Elektroden und der Kontaktpads, aufgetragen (Abb. 30A). Diese Schicht hielt jedoch den Recyclingprozeduren mit Piranha-Lösung (siehe 3.10) nicht stand. Daraufhin wurde getestet, welchen Einfluss der Verzicht auf SU8 bezüglich der elektrochemischen Messungen haben würde. Zusätzlich zu den Elektroden befanden sich auch Teile der Leiterbahnen der Arbeitselektroden in den Reaktionskammern. Ein Verzicht auf SU8-Lack erhöhte dadurch die effektive Größe der Elektrode um ca. 30 % von 2,84 mm² auf 3,94 bzw. 3,82 mm², je nach dem ob die Elektrode mit einer geraden oder einer gewinkelten Leiterbahn innerhalb der Reaktionskammer verbunden war (Abb. 30B). Die Elektrodenflächen für gerade und gewinkelte Leiterbahnen unterschieden sich nur um 3 %, sodass von nahezu gleich großer Fläche für alle Elektroden ausgegangen werden konnte. Allerdings betrug der Unterschied zur Elektrodenfläche mit SU8 (ohne Leiterbahn) ungefähr 1 mm².

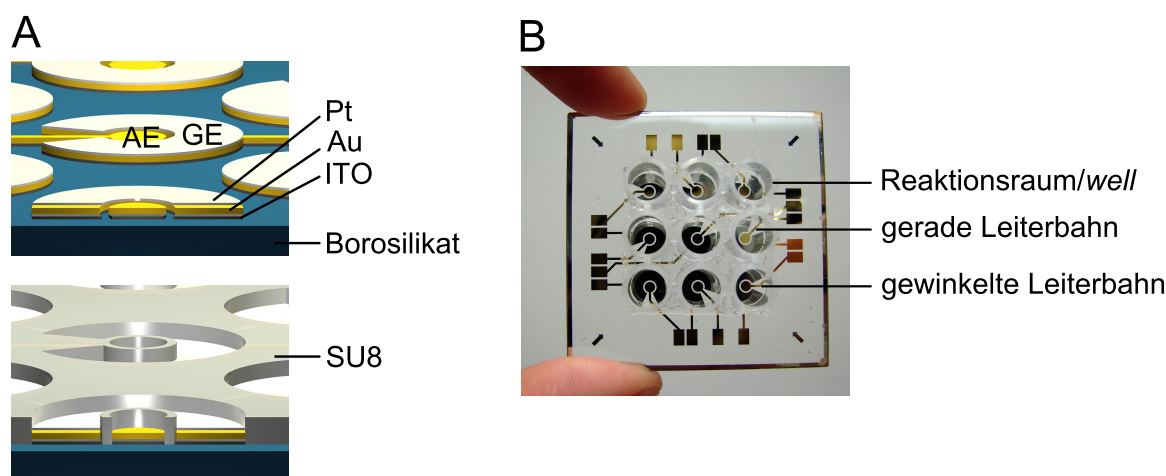


Abbildung 30: Aufbau des 9WPtE-Elektrodenarraychips. **A:** Der Schichtaufbau der Elektroden ist schematisch dargestellt, bestehend aus dem Haftvermittler Indiumzinnoxid (ITO) auf Borosilikat, gefolgt von Gold (Au) und Platin (Pt) (Schichthöhe nicht maßstabsgetreu). Die untere Abbildung zeigt die SU8-Schicht, welche auf den gesamten Array aufgetragen wurde, mit Ausnahme der Elektroden und Kontaktpads (hier nicht sichtbar). **B:** Die Leiterbahnen der Arbeitselektroden befanden sich teilweise in den Reaktionskammern. Jeweils fünf dieser Leiterbahnstücken eines Chips waren gerade und vier gewinkelt.

Sowohl der Einfluss des Flächenunterschieds zwischen Elektroden mit und ohne SU8 auf die

elektrochemischen Messungen, als auch der Einfluss des Flächenunterschieds zwischen Elektroden mit gewinkelter und gerader Leiterbahn wurden untersucht. Verglichen wurden impedimetrische und zykovoltammetrische Messdaten von 9WPtE-Chips, die durch HF-Sputtern hergestellt worden waren und bei denen ITO als Haftvermittler verwendet worden war.

Zyklovoltammetrie Die elektrochemischen Eigenschaften der Arbeitselektroden von Elektrodenarraychips mit und ohne SU8 wurden zykovoltammetrisch untersucht. Dabei wurden die Elektroden ohne SU8 zusätzlich nach geraden und gewinkelten Leiterbahnen unterschieden. CV-Messungen wurden in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyanid durchgeführt. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,05 und 0,35 V mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen.

Es wurde kein signifikanter Unterschied in den CV-Parametern zwischen SU8-freien Elektroden mit geraden und solchen mit gewinkelten Leiterbahnen nachgewiesen (Tab. 8, Abb. 31), d. h. der 3 %ige Flächenunterschied zwischen diesen Elektroden hatte keine Auswirkungen auf die zykovoltammetrischen Messungen. Hingegen konnten signifikante Unterschiede zwischen mit SU8 beschichteten und unbeschichteten Elektrodenarraychips beobachtet werden. Die Peakstromstärken ($I_{p,a}$, $I_{p,k}$) mit SU8 waren um ca. 35 % kleiner als ohne SU8. Die gemessene Peakstromhöhe ist nach der Randles-Sevcik-Gleichung (Formel 3) direkt proportional zur Fläche der Elektrode. Da diese durch Weglassen von SU8 um ca. 30 % stieg, lassen sich damit die höheren Peakstromstärken für die Elektroden ohne SU8 erklären. Die Peakseparation betrug mit SU8 83 ± 9 mV und ohne SU8 93 ± 5 mV für Elektroden mit gerader und 93 ± 4 mV für Elektroden mit gewinkelter Leiterbahn. Der Unterschied wurde als vernachlässigbar angesehen. Genauso wurde für Elektroden ohne SU8 ein geringfügig niedrigeres offenes Zellpotential gemessen, was aber angesichts der Standardabweichungen von ca. 10 mV ebenfalls als vernachlässigbar angesehen wurde.

Tabelle 8: CV-Parameter $I_{p,a}$, $I_{p,k}$, E'^o (vs. Ag/AgCl) und ΔE_p für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und Elektroden ohne SU8-Lack mit geraden (- SU8 (-)) und gewinkelten (- SU8 (∠)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer. Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte von mindestens 12 Elektroden \pm die Standardabweichungen (in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl).

	+ SU8	- SU8 (-)	- SU8 (∠)
$I_{p,a}/\mu A$	$4,44 \pm 0,64$	$6,39 \pm 0,30$	$6,71 \pm 0,29$
$I_{p,k}/\mu A$	$-4,44 \pm 0,61$	$-6,75 \pm 0,34$	$-7,02 \pm 0,33$
E'^o/mV	145 ± 7	134 ± 6	138 ± 14
$\Delta E_p/mV$	83 ± 9	93 ± 5	93 ± 4

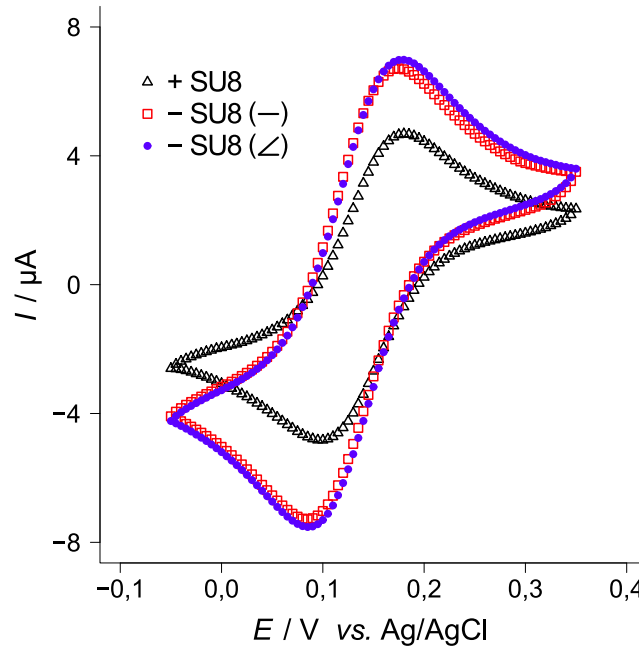


Abbildung 31: CV-Diagramme für Elektroden mit und ohne SU8-Isolierungsschicht. Das Zyklovoltammogramm einer Elektrode mit SU8-Schicht (schwarzes Dreieck, + SU8) zeigte deutlich geringere Peakstromstärken im Vergleich zu den Zyklovoltammogrammen der Elektroden ohne SU8 mit gerader Leiterbahn (rotes Quadrat, - SU8 (—)) und gewinkelter Leiterbahn (blauer Kreis, - SU8 (∠)). Hingegen unterschieden sich die Zyklovoltammogramme der Elektroden ohne SU8 mit gerader und gewinkelter Leiterbahn nicht signifikant. Gemessen wurde in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl.

Impedanzspektroskopie Impedanzspektren für den Vergleich der 9WPtE-Elektrodenarray-chips mit und ohne SU8 wurden zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl bei einer Wechsellspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen. Eine numerische Anpassung der Messdaten mit Hilfe eines abgewandelten Randles-Modells^[80] $((R_{ct} - Z_W) || CPE) - R_s$ erlaubte die Bestimmung der Impedanzparameter.

In Abb. 32 sind die ermittelten Werte für die Parameter R_{ct} , R_s , A , n und σ für Elektroden mit SU8 (+ SU8) und für Elektroden ohne SU8 in Balkendiagrammen dargestellt. Die Elektroden ohne SU8 sind zusätzlich eingeteilt in Elektroden mit gerader (- SU8 (—)) und gewinkelter (- SU8 (∠)) Leiterbahn. Zwischen Elektroden ohne SU8 mit geraden Leiterbahnen und solchen ohne SU8 mit gewinkelten Leiterbahnen wurden keine signifikanten Unterschiede in den Impedanzparametern gemessen. Der Flächenunterschied von ca. 3 % zwischen diesen Elektroden hatte folglich keine Auswirkungen auf die Impedanzmessung. Wohingegen zwischen den Elektroden mit und ohne SU8 Unterschiede in den Parametern R_s , A und σ beobachtet wurden. Der Lösungsmittelwiderstand betrug mit SU8-Lack $121 \pm 7 \, \Omega$ und ohne SU8 nur $88 \pm 5 \, \Omega$ für gerade und $85 \pm 5 \, \Omega$ für gewinkelte Leiterbahnen. Da R_s wie jeder Widerstand abhängig

von der Querschnittsfläche A_E des Leiters (Elektrolyt zwischen Arbeits- und Gegenelektrode) ist führte der Verzicht auf SU8 und die damit verbundene größere Elektrodenfläche zu einer Abnahme des Lösungsmittelwiderstands (Formel 30 mit l als Länge und ρ als spezifischem Widerstand des Leiters).

$$R = \frac{l}{A_E} \rho \quad (30)$$

Ebenso fiel der Warburgkoeffizient ohne SU8-Lack mit $7,12 \pm 0,29$ für gerade und $6,77 \pm 0,23 \text{ k}\Omega(\sqrt{s})^{-1}$ für gewinkelte Leiterbahnen geringer aus, als der mit SU8 ($10,40 \pm 1,02 \text{ k}\Omega(\sqrt{s})^{-1}$). Der Warburgkoeffizient und somit auch die Warburgimpedanz sind indirekt proportional zur Fläche der Elektrode (Formel 29). Somit lässt sich die Verringerung beider mit einer ca. 30 %igen Flächenzunahme nach Verzicht auf SU8-Lack erklären. Der CPE-Parameter A lag für die Elektrodenarraychips mit SU8 bei $1,62 \pm 0,58 \text{ }\mu\text{Fs}^{n-1}$ und für solche ohne SU8 bei $2,07 \pm 0,36$ für gerade und $2,12 \pm 0,34 \text{ }\mu\text{Fs}^{n-1}$ für gewinkelte Leiterbahnen. Da A ähnlich einer Kapazität ist, nimmt dieser Parameter mit der Fläche des CPE zu. Die Fläche des CPE entspricht der Fläche der Elektrode. Eine Flächenvergrößerung der Elektrode von knapp 30 % bei Weglassen des SU8-Lacks hatte also eine Vergrößerung von A um ca. 20 % zur Folge. R_{ct} und n unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Elektroden mit und ohne SU8. Diese beiden Parameter stehen in keinem Zusammenhang zur Fläche der Elektrode. Die gesamten Daten sind der Tab. 9 zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ca. 30 %ige Vergrößerung der Elektrodenflächen durch Verzicht auf SU8-Lack in einer signifikanten Änderung der elektrochemischen Eigenschaften resultierte. Allerdings wirkten sich diese Änderungen nicht negativ auf die Signalqualität aus. Vielmehr resultierte der Verzicht auf SU8 in einer Verbesserung der CV- und Impedanzsignale. So wurden Zyklovoltammogramme mit höheren Peakstromstärken gemessen. Impedanzmessungen ergaben für Elektroden ohne SU8 eine höhere Kapazität der Ionendoppelschicht bzw. einen höheren Wert für A und damit eine niedrigere Impedanz des CPE. Hohe Peakstromstärken in den CV-Messungen und niedrige Impedanzen der sauberen Elektroden wurden angestrebt, um eine sensitivere Detektion von Veränderungen, z. B. durch den Biosensoraufbau, zu ermöglichen. Darüber hinaus waren die Veränderungen der elektrochemischen Eigenschaften durch Verzicht auf SU8-Lack reproduzierbar. Der ohne SU8-Schicht bestehende Flächenunterschied von 3 % zwischen Elektroden mit geraden und solchen mit gewinkelten Leiterbahnen, hatte keine Auswirkungen auf die CV- und Impedanzsignale. Da somit ohne SU8 keine negativen Folgen für die elektrochemischen Messungen zu beobachten waren, wurden zu Gunsten der Recyclebarkeit alle Elektrodenarraychips für die biosensorische Anwendung ohne SU8 gefertigt.

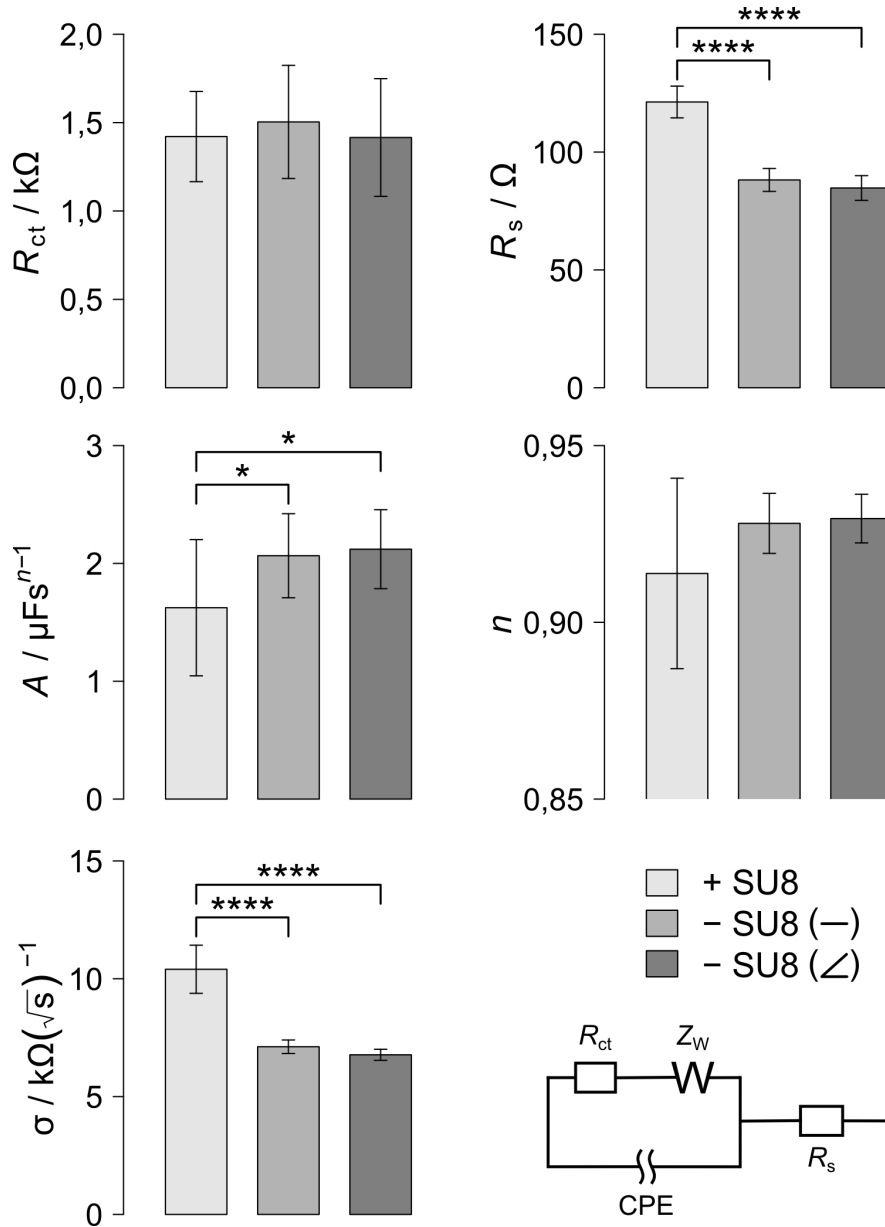


Abbildung 32: Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und Elektroden ohne SU8-Lack mit geraden (- SU8 (-)) und gewinkelten (- SU8 (∠)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer. Mit Ausnahme des Ladungstransferwiderstands und n wurden für alle Impedanzparameter signifikante Unterschiede zwischen Elektrodenarraychips mit und solchen ohne SU8-Schicht bestimmt. So waren der Lösungsmittelwiderstand R_s und der Warburgkoeffizient σ ohne SU8 um ca. 30 % kleiner als mit und der Wert für den Parameter A war ohne SU8 ca. 20 % größer als mit SU8. Zwischen Elektroden ohne SU8 mit geraden Leiterbahnen und solchen ohne SU8 mit gewinkelten Leiterbahnen wurden keine signifikanten Unterschiede in den Impedanzparametern gemessen. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von mindestens zwölf Elektroden (in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl). Die Signifikanzen sind angegeben als * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Tabelle 9: Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ für Elektroden mit SU8-Lack (+ SU8) und ohne SU8-Lack mit geraden (- SU8 (-)) und gewinkelten (- SU8 (\angle)) Leiterbahnen innerhalb der Reaktionskammer. Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte von mindestens zwölf Elektroden \pm die Standardabweichungen (in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl).

	+ SU8	- SU8 (-)	- SU8 (\angle)
$R_{ct}/k\Omega$	$1,42 \pm 0,26$	$1,50 \pm 0,32$	$1,42 \pm 0,33$
R_s/Ω	121 ± 7	88 ± 5	85 ± 5
$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	$1,62 \pm 0,58$	$2,07 \pm 0,36$	$2,12 \pm 0,34$
n	$0,91 \pm 0,03$	$0,93 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,01$
$\sigma/k\Omega(\sqrt{s})^{-1}$	$10,40 \pm 1,02$	$7,12 \pm 0,29$	$6,77 \pm 0,23$

4.5.2 Reproduzierbarkeit der Impedanzmessungen

Die Reproduzierbarkeit der impedimetrischen Daten wurde hinsichtlich verschiedener Produktionschargen der Elektrodenarraychips überprüft. Zu einer Charge wurden dabei alle in einem Prozess hergestellten Chips gezählt, wobei auf Grund der Ausmaße der Sputterkammer nur maximal vier Arrays in einem Durchlauf produziert werden konnten. Jede Elektrode wurde vor der ersten Verwendung impedimetrisch vermessen und die Messdaten der Chargen verglichen. Die Impedanzspektren wurden in 0,1 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen. Verglichen wurden Elektrodenarraychips, die durch HF-Sputtern hergestellt worden waren, bei denen ITO als Haftvermittler verwendet worden war und die keine SU8-Isolierungsschicht besaßen.

Die Impedanzdaten wurden mit Hilfe des bereits erwähnten abgewandelten Randles-Ersatzschaltbildes^[80] ausgewertet ($((R_{ct} - Z_W)||CPE) - R_s$). Die berechneten Parameter des Modells sind in Abb. 33 in Abhängigkeit von der Chargennummer dargestellt. Das für die Anpassung verwendete Ersatzschaltbild ist in Abb. 33B zu sehen.

Generell sind die Unterschiede für die Chargen bezüglich der Impedanzparameter gering. Lediglich die Chargen 2 und 4 zeigten signifikante Unterschiede in einigen Parametern verglichen mit den anderen Chargen. So wurde für die Charge 4 ein höherer Wert für A von $2,7 \pm 0,6 \mu\text{Fs}^{n-1}$ verglichen mit ca. $2,0 \mu\text{Fs}^{n-1}$ für die restlichen Chargen gemessen (Tab. 10). Auch der Parameter n unterschied sich zwischen Charge 4 und den anderen Chargen signifikant, allerdings lediglich um ca. 0,02, was im Bereich der Standardabweichung lag. Der Unterschied in den CPE-Parametern zwischen Charge 4 und den anderen Chargen kann möglicherweise darauf zurück geführt werden, dass die Elektrodenoberflächen der Chips aus Charge 4 rauer und damit größer waren. Dies würde eine höhere Kapazität bzw. ein höheres A erklären. Eine Erhöhung der Rauigkeit, also stärkere Inhomogenitäten der Elektrodenoberflächen,

würden auch ein kleineres n erklären. Für Charge 2 wurde ein signifikant höherer Wert für R_{ct} von $560 \pm 130 \Omega$ im Vergleich zu den restlichen Chargen mit ca. 400Ω bestimmt. Allerdings war dieser Unterschied angesichts einer Standardabweichung von 130Ω vernachlässigbar.

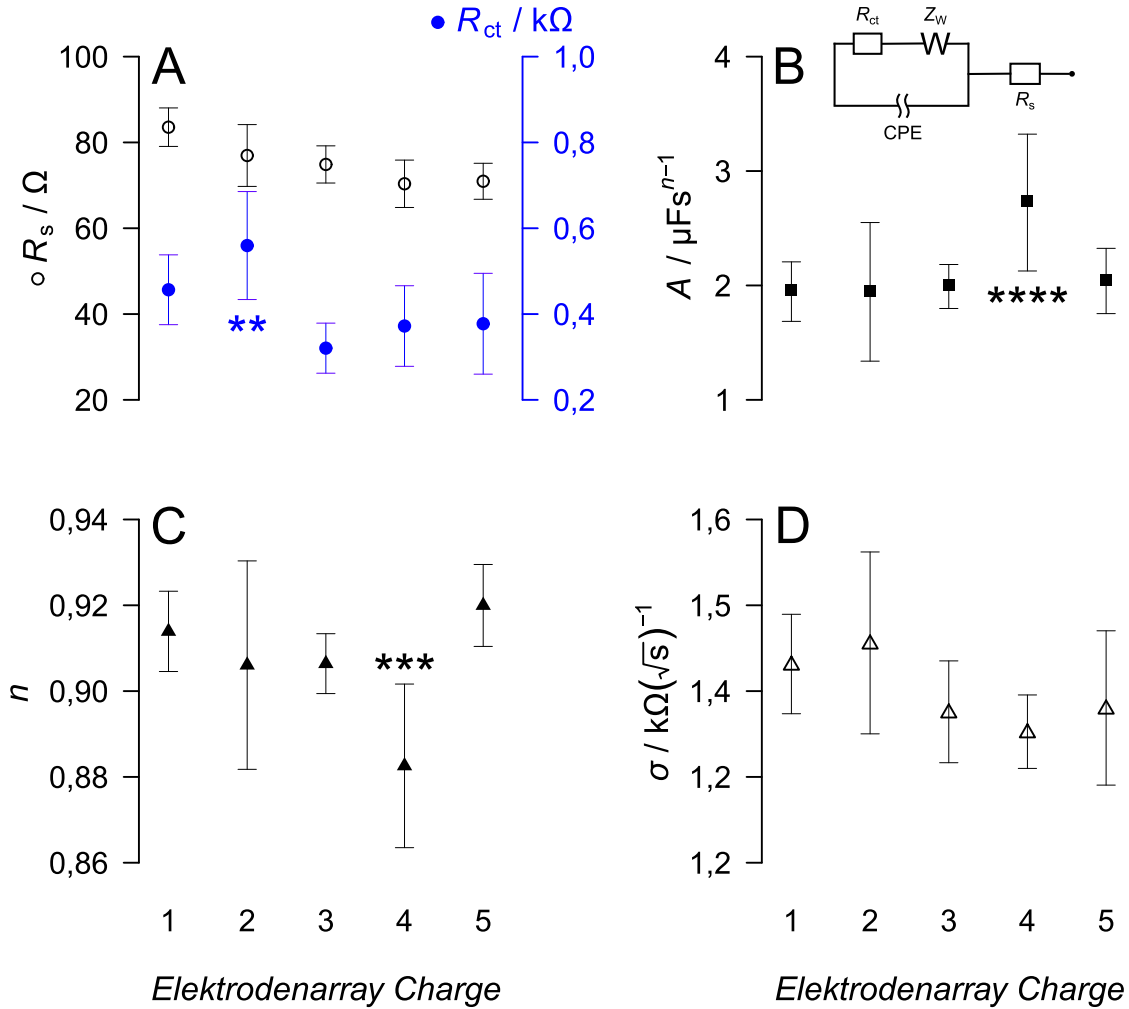


Abbildung 33: Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ in Abhängigkeit von der Elektrodenarraycharge. Die Impedanzparameter der Elektroden aus fünf unterschiedlichen Chargen zeigten nur geringe Unterschiede. Für Charge 4 konnten signifikante Abweichungen in den CPE-Parametern A (B) und n (C) festgestellt werden. Für Charge 2 war der R_{ct} -Wert verglichen mit den anderen Chargen um ca. 30 % erhöht (A). Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von mindestens zwei 9WPtE-Elektrodenarraychips pro Charge mit je mindestens acht Elektroden. Signifikanzen sind mit ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001 angegeben. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl (Ersatzschaltbild in B nach Randles^[80]).

Tabelle 10: Impedanzparameter R_{ct} , σ , R_s , A und n als Funktion der Chargennummer. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von mindestens zwei Elektrodenarraychips pro Charge mit je mindestens acht Elektroden in 0,1 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid.

Charge	R_{ct}/Ω	R_s/Ω	$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	n	$\sigma/\text{k}\Omega(\sqrt{s})^{-1}$
1	457 ± 81	84 ± 4	$1,95 \pm 0,26$	$0,91 \pm 0,01$	$1,43 \pm 0,06$
2	560 ± 126	77 ± 7	$1,94 \pm 0,61$	$0,91 \pm 0,02$	$1,46 \pm 0,11$
3	320 ± 58	75 ± 4	$1,99 \pm 0,19$	$0,91 \pm 0,01$	$1,37 \pm 0,06$
4	372 ± 94	70 ± 6	$2,72 \pm 0,60$	$0,88 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,04$
5	377 ± 117	71 ± 4	$2,04 \pm 0,29$	$0,92 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,09$

Als möglicher Grund für das unterschiedliche Impedanzverhalten der Elektrodenarraychargen kam auch die Schichtdicke der Elektroden in Frage. Während des Sputtervorgangs wurde die Schichtdicke mittels einer Quarzkristallmikrowaage verfolgt, indem an den piezoelektrischen Quarzkristall Wechselspannung angelegt wurde, wodurch er sich oszillierend verformte. Die Frequenz dieser Oszillation sank mit der zusätzlichen Masse durch die aufgetragenen Metallschichten, woraus auf die Dicke der Metallschichten geschlossen werden konnte. Mikroskopische Schichtdickenmessungen nach dem Sputtern ergaben jedoch Schwankungen der Schichtdicke zwischen 300 bis 1000 nm. Schwankungen in der Elektrodendicke könnten sowohl die Unterschiede der Impedanzparameter zwischen den Chargen, als auch ihre relativ hohe Standardabweichung (R_{ct} und A , siehe Tab. 10) erklären. Daher wurde die Beziehung zwischen den Impedanzdaten und der Schichtdicke untersucht. Diese Untersuchungen ergaben keine nennenswerte Korrelation zwischen der Schichtdicke und den berechneten Parametern R_{ct} , R_s , A , n und σ . In Abb. 34 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

Die Pearsonschen Korrelationskoeffizienten (r_P) zwischen den Parametern und der entsprechenden Schichtdicke beliefen sich auf -0,15 für R_{ct} , -0,33 für R_s , 0,05 für A , -0,23 für n und -0,12 für σ . Theoretisch bewegt sich dieser Korrelationskoeffizient zwischen 1 und -1 und je näher er bei diesen Extrema liegt, desto besser korreliert sind die betrachteten Variablen. Die niedrigen Werte für r_P deuteten auf eine geringe Korrelation zwischen den Impedanzparametern und der Schichtdicke hin. Die Elektroden einer Charge, in Abb. 34 durch unterschiedliche Symbole gekennzeichnet, zeigten separat betrachtet zwar eine ähnliche Schichtdicke. Jedoch konnte auch innerhalb der Chargen nur eine geringe Korrelation der Impedanzparameter mit der Schichtdicke beobachtet werden.

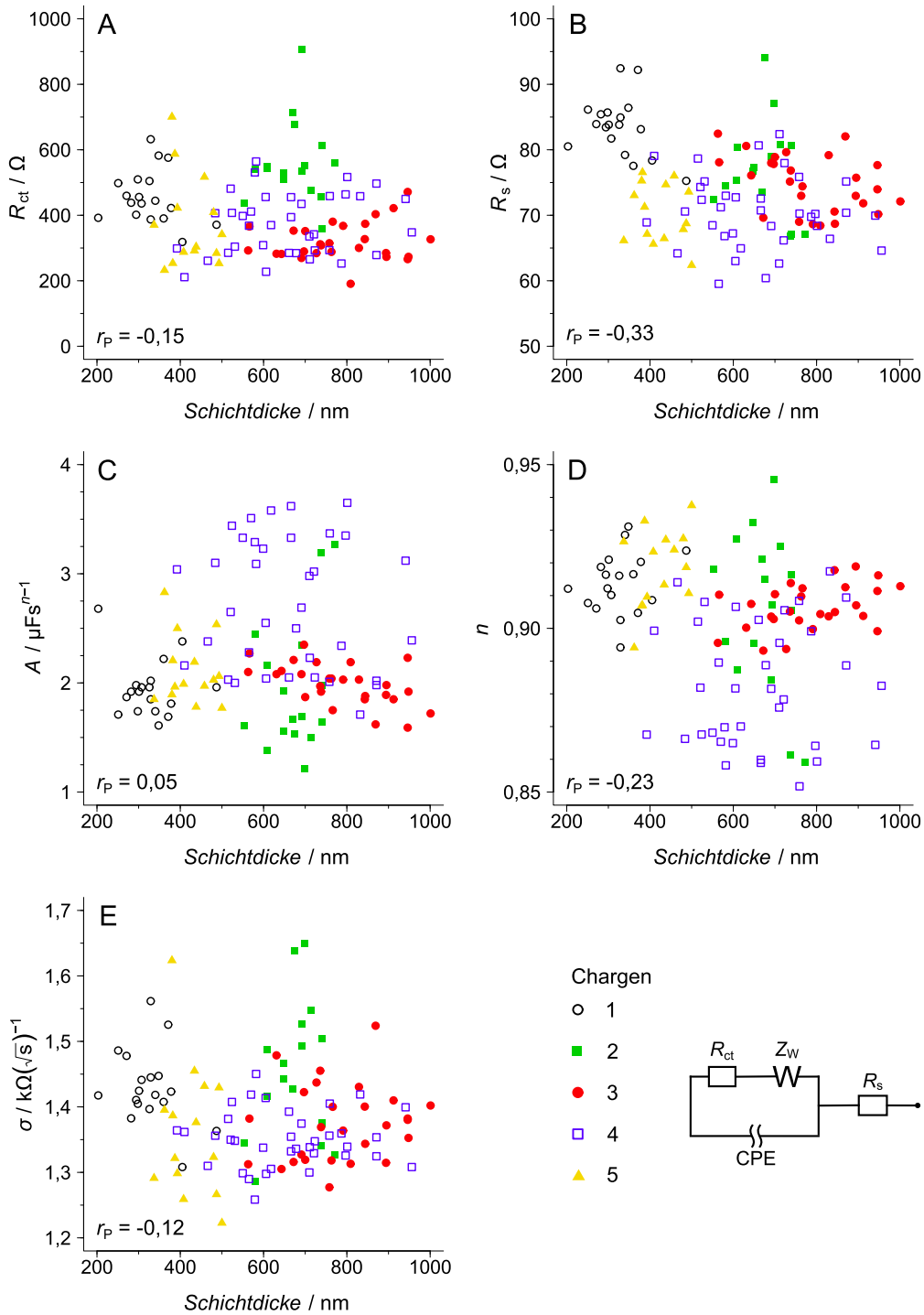


Abbildung 34: Korrelation der Impedanzparameter der Arbeitselektroden mit ihrer Schichtdicke. Es bestand nur eine geringe Korrelation der Impedanzparameter R_{ct} (A), R_s (B), A (C), n (D) und σ (E) mit der Schichtdicke. Die Pearsonschen Korrelationskoeffizienten r_P sind in den Teilbildern für die Gesamtheit der Elektroden angegeben. Jeder Datenpunkt entspricht dem Parameterwert für eine Elektrode (bestimmt mit Ersatzschaltbild nach Randles^[80] rechts unten). Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyano in 0,1 M KCl.

Die Impedanzparameter jedes einzelnen Elektrodenarraychips zeigten ähnliche Streuung (Standardabweichung in Tab. 11), wie die Daten für die Chargen (Standardabweichung in Tab. 10). Um auszuschließen, dass die Unterschiede zwischen den Chargen und die relativ hohen Standardabweichungen durch Messartefakte zustande gekommen waren, wurde die Stabilität der Impedanzparameter bei wiederholter Messung einer Elektrode überprüft. Dazu wurden die Elektroden nach der Herstellung dreimal in zehnminütigem Abstand vermessen. Es wurden Impedanzspektren verglichen, die in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyanid zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen worden waren.

Tabelle 11: Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ als Funktion der Elektrodenarray-chipnummer. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von mindestens zwei Elektrodenarraychips pro Charge mit je mindestens acht Elektroden vermessen in 0,1 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid.

Charge	Chip	R_{ct}/Ω	R_s/Ω	$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	n	$\sigma/\text{k}\Omega(\sqrt{\text{s}})^{-1}$
1	1	425 ± 73	82 ± 4	$2,00 \pm 0,33$	$0,92 \pm 0,01$	$1,40 \pm 0,04$
	2	488 ± 81	85 ± 5	$1,89 \pm 0,17$	$0,91 \pm 0,01$	$1,46 \pm 0,06$
2	3	625 ± 138	81 ± 7	$1,65 \pm 0,35$	$0,92 \pm 0,02$	$1,50 \pm 0,12$
	4	494 ± 70	73 ± 6	$2,23 \pm 0,69$	$0,89 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,07$
3	5	379 ± 48	72 ± 4	$1,85 \pm 0,21$	$0,91 \pm 0,01$	$1,38 \pm 0,07$
	6	302 ± 34	77 ± 3	$2,03 \pm 0,13$	$0,91 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,03$
	7	281 ± 39	75 ± 5	$2,09 \pm 0,16$	$0,90 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,05$
4	8	271 ± 32	78 ± 3	$2,06 \pm 0,08$	$0,90 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,03$
	9	386 ± 91	68 ± 4	$3,02 \pm 0,53$	$0,88 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,04$
	10	407 ± 72	66 ± 4	$2,55 \pm 0,54$	$0,88 \pm 0,02$	$1,36 \pm 0,05$
	11	425 ± 90	70 ± 2	$3,26 \pm 0,18$	$0,86 \pm 0,01$	$1,34 \pm 0,05$
5	12	351 ± 43	69 ± 5	$1,81 \pm 0,09$	$0,93 \pm 0,01$	$1,32 \pm 0,07$
	13	443 ± 122	70 ± 3	$2,21 \pm 0,26$	$0,92 \pm 0,01$	$1,35 \pm 0,06$
	14	338 ± 144	73 ± 3	$2,11 \pm 0,30$	$0,91 \pm 0,01$	$1,47 \pm 0,07$

Abb. 35 zeigt die Impedanzspektren einer Elektrode für drei Messungen mit einem Abstand von 10 min. Im Nyquistplot konnte kein Unterschied zwischen den drei Messungen beobachtet werden. Auch die numerische Auswertung der Impedanzdaten ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Messungen für die Parameter R_{ct} , R_s , A , n und σ (Tab. 12). Die Unterschiede zwischen den Chargen und die Streuung der Messparameter wurden folglich nicht durch Messartefakte verursacht.

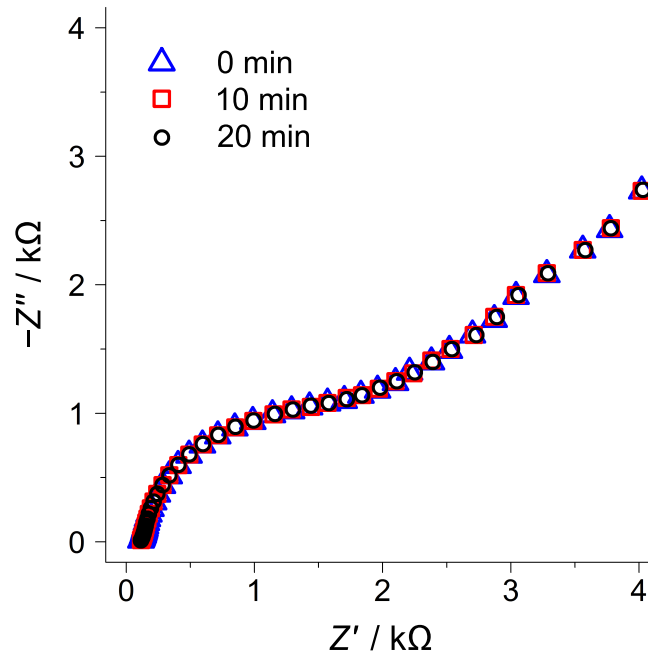


Abbildung 35: Zeitliche Stabilität der Impedanzspektren. Der Nyquistplot zeigt beispielhaft mehrfach aufgenommene Spektren einer Elektrode. Zwischen den Messungen lag ein zeitlicher Abstand von 10 min. Die Spektren wiesen keine Unterschiede auf. Als Messlösung diente 1 mM Ferri-/Ferrocyamid in 0,1 M KCl.

Tabelle 12: Impedanzparameter R_{ct} , R_s , A , n und σ als Funktion des Messzeitpunktes. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von 22 Elektroden, die dreimal (10 min Abstand) in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyamid impedimetrisch vermessen worden waren.

t/min	$R_{ct}/\text{k}\Omega$	R_s/Ω	$A/\mu\text{Fs}^{n-1}$	n	$\sigma/\text{k}\Omega(\sqrt{s})^{-1}$
0	$1,53 \pm 0,29$	118 ± 7	$1,73 \pm 0,60$	$0,90 \pm 0,02$	$10,18 \pm 0,39$
10	$1,51 \pm 0,28$	118 ± 7	$1,74 \pm 0,69$	$0,90 \pm 0,02$	$10,19 \pm 0,35$
20	$1,50 \pm 0,28$	117 ± 7	$1,72 \pm 0,66$	$0,90 \pm 0,02$	$10,19 \pm 0,35$

Der 9WPtE-Elektrodenarray war so entworfen, dass die Arbeitselektroden unterschiedlich lange Leiterbahnen besaßen. Um einen Einfluss der Array-Geometrie auf die Streuung der Messparameter auszuschließen, wurden jeweils die Elektroden mit derselben Position auf den Chips verglichen. Die Standardabweichungen für R_{ct} und A betrugen, ähnlich wie innerhalb der Chargen und innerhalb der Chips, ca. 20 % des jeweiligen Messwertes und für R_s , n und σ ca. 5 %. Demnach wurde kein Zusammenhang zwischen der Streuung der Messwerte und der Chip-Geometrie beobachtet.

Abschließend lässt sich festhalten, dass zwischen den Elektroden verschiedener Chargen Unterschiede in den Impedanzparametern bestanden. Die Streuung innerhalb der Chargen war ähnlich groß, wie die Streuung innerhalb eines Elektrodenarraychips. Unterschiede in der Schichtdicke konnten als Grund für die Chargenunterschiede und die Streuung der Parameter ausgeschlossen werden. Es bestand keine deutliche Korrelation zwischen der Schichtdicke und den Impedanzparametern. Auch Messartefakte konnten ausgeschlossen werden, da bei mehrmaligem Impedanzmessen mit derselben Elektrode keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Messungen beobachtet wurden. Die Impedanzmessung konnte als stabil betrachtet werden. Da auch die Geometrie des Elektrodenarrays nicht die Ursache für die Streuung der Impedanzparameter war, wurden produktionsabhängige Unterschiede in der Oberflächenrauigkeit angenommen. Um einen Einfluss der Streuung auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu vermeiden, wurden in folgenden Experimenten zum Aufbau von Biosensoren teilweise Normierungen der Daten vorgenommen, die im Einzelfall angegeben sind. Die gemessenen Impedanzparameter zu einem bestimmten Zeitpunkt (z. B. $R_{ct}(x)$), wurden dabei immer auf einen vergleichbaren Ausgangswert (z. B. $R_{ct}(0)$) bezogen:

$$\Delta R_{ct} = \frac{R_{ct}(x) - R_{ct}(0)}{R_{ct}(0)} \cdot 100 \% \quad (31)$$

4.5.3 Recycling der 9WPtE-Elektrodenarraychips

Aufgrund der zeitintensiven Fertigung der 9WPtE-Elektrodenarrays war eine Prozedur zur Regeneration der Elektroden für mehrmaliges Verwenden erforderlich. Für das Recycling wurden zuerst je nach Anwendung des Elektrodenarrays vorhandene Proteine mittels Trypsinierung abgelöst (siehe 3.10). Nach dem Trocknen wurde mit Aceton und Piranha-Lösung chemisch gereinigt. Im Anschluss wurden CV- und Impedanzmessungen durchgeführt, um die erfolgreiche Reinigung zu verifizieren. Als Kriterien dazu dienten für die zykelvoltammetrischen Messungen die Änderungen der Stromstärkepeaks ($I_{p,a}$, $I_{p,k}$) und der Peakseparation (ΔE_p) und für die Impedanzmessungen die Änderungen der Parameter R_{ct} , R_s , A , n und σ . Zusätzlich zu den elektrochemischen Messungen wurde mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht, ob durch mehrmaliges Benutzen die Oberflächentopographie der Elektroden verändert worden war. Untersucht wurden Elektroden, die durch HF-Sputtern mit ITO als Haftvermittler und ohne SU8-Lack hergestellt und 15-20 Mal benutzt worden waren.

4.5.3.1 Rasterkraftmikroskopie zur Untersuchung der Oberflächentopographie

Es wurden AFM-Aufnahmen im *Peak Force Tapping*-Modus an Luft mit einem Siliziumnitrid-*Cantilever* angefertigt. Die Aufnahmen (Abb. 36) zeigten Unterschiede in der Oberflächen-

topographie zwischen den unbenutzten Arbeitselektrode und den Elektroden nach 15-20 Recyclingprozeduren. Die Korngröße war zwar ähnlich, jedoch nach 15-20 Recyclingprozeduren nicht mehr so gleichmäßig, wie für die unbenutzten Elektroden. Die Oberflächen der benutzten Elektroden wiesen stärkere Höhenunterschiede auf, als die der unbenutzten Elektroden. Eine Analyse der Oberflächenrauigkeit nach 3.4 ergab eine Verdopplung der Rauigkeit von $r_a = 1,9 \pm 0,4$ nm für die unbenutzten Elektroden auf $r_a = 4,0 \pm 1,0$ nm für die 15-20 Mal benutzten Elektroden (je drei unabhängige Messungen). Der Anstieg der Rauigkeit war entweder durch Verunreinigungen oder durch Schäden der Elektrodenoberfläche verursacht.

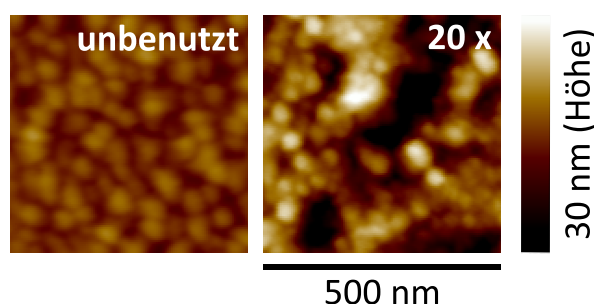


Abbildung 36: Oberflächentopographien der unbenutzten und der 20 Mal benutzten und recycelten Arbeitselektrode. Die AFM-Aufnahmen wurden durch Glättung zweiter Ordnung und einen Tiefpassfilter der *NanoScope*-Analysesoftware bearbeitet. Die 20 Mal benutzte Elektrodenoberfläche zeigte im Vergleich zur unbenutzten Elektrodenoberfläche größere Höhenunterschiede (Farbskala und Maßstab gelten für beide Aufnahmen).

4.5.3.2 Zyklovoltammetrie

Die zykvoltammetrischen Eigenschaften der 15-20 Mal recycelten Elektroden wurden mit ihren Eigenschaften direkt nach der Herstellung verglichen. CV-Messungen wurden dafür in 0,1 M KCl und 1 mM Ferri-/Ferrocyanid durchgeführt. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,05 und 0,35 V mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen.

In Abbildung 37A ist das Zyklovoltammogramm einer unbenutzten frisch hergestellten Elektrode einem Zyklovoltammogramm gegenüber gestellt, dass mit derselben Elektrode nach 20 Verwendungen und Recyclingzyklen gemessen worden war. Es waren nur geringe Veränderungen in der typischen Form der Zyklovoltammogramme erkennbar. So wurden auch nach 20 Nutzungen definierte gleichgroße Stromstärkepeaks für Oxidation und Reduktion gemessen, was auf eine reversible Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid hindeutete. Änderungen wurden in der Höhe der Stromstärkepeaks und in der Peakseparation beobachtet. Die relativen Änderungen der CV-Parameter wurden nach Formel 32 berechnet, wobei $x(alt)$ dem untersuchten Parameter nach 15-20 Recyclingprozeduren entsprach und $x(neu)$ demselben

Parameter gemessen mit der unbenutzten Elektrode direkt nach der Herstellung.

$$\Delta x = \frac{x(\text{alt}) - x(\text{neu})}{x(\text{neu})} \cdot 100 \% \quad (32)$$

In Abb. 37B sind die relativen Änderungen der CV-Parameter in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Die Peakstromstärken $I_{p,a}$ und $I_{p,k}$ hatten während 15-20 Nutzungen um ca. 10 % relativ zu den unbenutzten Elektroden abgenommen. Die Peakseparation war hingegen nach 15-20 Nutzungen um $13,6 \pm 2,1 \%$ gestiegen. Da die Änderungen der CV-Parameter mit 10-15 % gering ausfielen, wurde auch nach 15-20 Recyclingprozeduren eine ausreichende Signalqualität erreicht.

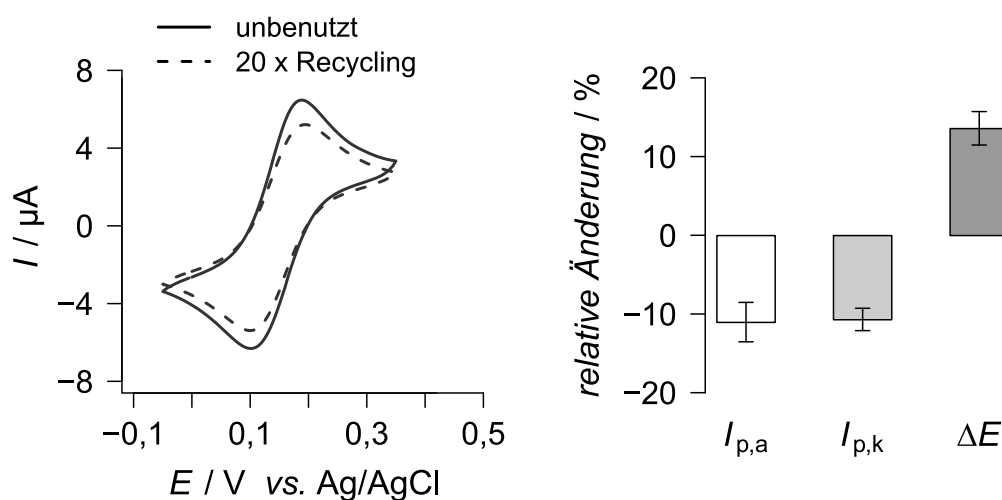


Abbildung 37: Vergleich von CV-Messungen mit Elektroden direkt nach der Herstellung und nach 15-20 Recyclingprozeduren. In A sind beispielhaft Zykelvoltammogramme einer Elektrode direkt nach der Herstellung (unbenutzt) und nach 20 Recyclingprozeduren dargestellt. Sie unterschieden sich nur geringfügig. B: Die relative Änderung der Peakstromstärken betrug für 15-20 Nutzungen ca. -10 % und die relative Änderung der Peakseparation ca. +15 %. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von fünf Elektrodenarraychips, wobei pro Array mindestens acht Elektroden bei 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl vermessen worden waren.

4.5.3.3 Impedanzspektroskopie

Impedanzspektren wurden verglichen zwischen frisch hergestellten Elektroden und denselben Elektroden nach 15-20 Recyclingprozeduren. Sie waren zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 1 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential gemessen worden.

Das Impedanzspektrum einer Elektrode nach 15-20 Nutzungen unterschied sich kaum vom Spektrum der frisch hergestellten Elektrode. Nur der typische Halbkreisdurchmesser war nach 15-20 Recyclingprozeduren geringfügig erhöht (Abb. 38), was auf einen Anstieg des Ladungstransferwiderstands schließen ließ. Eine numerische Anpassung der Messdaten mit Hilfe eines abgewandelten Randles-Modells^[80] $((R_{ct} - Z_W) || CPE) - R_s$ erlaubte die Bestimmung der Impedanzparameter. Deren relative Änderung wurde nach Formel 32 berechnet. Während R_s , A und n vernachlässigbare Änderungen zeigten, stiegen R_{ct} und σ durch 15-20 Nutzungen um $61,7 \pm 25,4$ % bzw. $25,0 \pm 5,0$ %. Durch die mehrmalige Benutzung der Elektroden hatten sich vermutlich Verunreinigungen auf der Oberfläche abgelagert, die zwar keinen Einfluss auf die Ionendoppelschicht (A und n) hatten, aber den Ladungstransfer und die Diffusion behinderten.

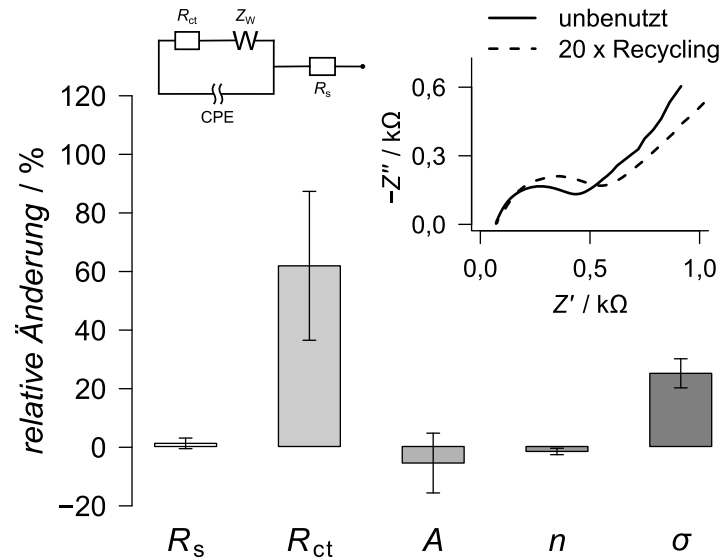


Abbildung 38: Vergleich von Impedanzmessungen mit Elektroden direkt nach der Herstellung und nach 15-20 Recyclingprozeduren. Selbst nach 20 Recyclingzyklen zeigte der Nyquistplot einer repräsentativ ausgewählten Elektrode nur geringfügige Änderungen. Als Messlösung wurde 1 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl verwendet. R_s , A und n zeigten keine Änderungen nach 15-20 Nutzungen der Elektroden. Für R_{ct} wurde eine relative Zunahme von ca. 60 % bestimmt und für σ ebenfalls eine relative Zunahme von ca. 25 %. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von fünf Elektrodenarraychips mit jeweils mindestens acht Elektroden (Ersatzschaltbild nach Randles^[80])

Durch 15-20 Nutzungen und Recyclingzyklen erhöhte sich die Rauigkeit der Elektrodenoberfläche. Mittels Rasterkraftmikroskopie wurde eine Verdopplung der mittleren Rauigkeit bestimmt. Auf die zykelvoltammetrischen Messungen hatte das mehrmalige Wiederverwenden der Elektroden nur geringfügigen Einfluss. Die Peakstromstärken und die Peakseparation

waren betroffen, erstere nahmen um ca. 10 % ab und letztere um ca. 15 % zu. Impedimetrische Untersuchungen zu Veränderungen der Elektrodenoberfläche durch 15-20 Recyclingprozeduren ergaben eine relative Zunahme des R_{ct} (ca. 60 %) und des Warburgkoeffizienten (ca. 25 %), beides Parameter, die die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid widerspiegeln. Eine Zunahme dieser Parameter bedeutete demnach eine Behinderung des Ladungstransfers und der Diffusion und somit eine Verringerung des Umsatzes der Redoxsubstanz. Die Korrelation von AFM-, CV- und Impedanzdaten ließ die Schlussfolgerung zu, dass die Elektroden durch mehrmaliges Benutzen verunreinigt wurden, sodass sie einerseits eine veränderte Oberflächentopographie mit erhöhter Rauigkeit zeigten und andererseits der Ladungstransfer behindert war.

Die Veränderungen der Elektrodeneigenschaften durch mehrmaliges Recycling wurden dennoch als gering eingeschätzt. Eine mittlere Rauigkeit von ca. 4 nm nach 15-20 Nutzungen entsprach immer noch einer relativ glatten Elektrodenoberfläche. So besaßen z. B. unbenutzte Elektroden, die durch DC- statt HF-Sputtern hergestellt worden waren, eine ähnliche Rauigkeit (siehe 4.5.1.1). Der Einfluss der mehrmaligen Verwendung auf die elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden ist in Anbetracht des wesentlich höheren Einflusses der Leitsalz- und Redoxionenkonzentration ebenfalls akzeptabel (siehe hierzu 4.4.1 und 4.4.3). Allein eine Erhöhung der KCl-Konzentration von 0,1 auf 0,5 M resultierte in einer relativen Abnahme der Peakseparation der CV-Messungen von ca. 30 %. Für den Ladungstransferwiderstand der Impedanzmessung wurde sogar eine relative Abnahme von ungefähr 95 % gemessen. Wurde die Ferri-/Ferrocyanidkonzentration von 1 auf 5 mM erhöht, so wurden für die Peakstromstärken der CV-Messungen relative Zunahmen von ca. 400 % und für den Impedanzparameter R_{ct} eine relative Abnahme von ca. 80 % beobachtet. Falls notwendig, könnten demnach durch Erhöhung der Ionenkonzentrationen im Elektrolyten Auswirkungen der wiederholten Verwendung der Elektroden auf die CV- und Impedanzsignalstärke ausgeglichen werden.

4.6 Herstellung und Charakterisierung von funktionalen Oberflächen

Zum Aufbau von Biosensoren basierend auf dem entwickelten 9WPtE-Elektrodenarraychip wurden biologische Erkennungsmoleküle, Antikörper oder Antigene, an die Arbeitselektroden des Elektrodenarraychips gekoppelt. Als Kopplungsstrategie wurde eine kovalente Technik verwendet, die Chemoligation mittels Thiolen. Dazu wurden die Elektroden zuerst für 18 h mit den Thiollösungen inkubiert. Thiole lagern sich durch Chemisorption auf Goldoberflächen an und organisieren sich dann selbstständig zu Monoschichten. An diese sich selbstorganisierenden Monoschichten (SAMs, *self-assembled monolayers*) wurden im Anschluss die biologischen Erkennungsmoleküle kovalent gebunden (Abb. 39). Dafür wurden Carboxylgrup-

pen der Thiolmoleküle mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) aktiviert. Die dabei entstandenen NHS-Aktivester wurden mit den Antikörpern oder Antigenen inkubiert. Sie reagierten mit deren primären Aminresten (z. B. Lysinseitenkette) unter Ausbildung von Amidbindungen. Die so geschaffenen biologisch-funktionalen Elektrodenoberflächen wurden genutzt, um Analyten spezifisch zu binden. Die Umwandlung des Bindungssignals in ein elektrisches Signal erfolgte durch elektrochemische Messungen.

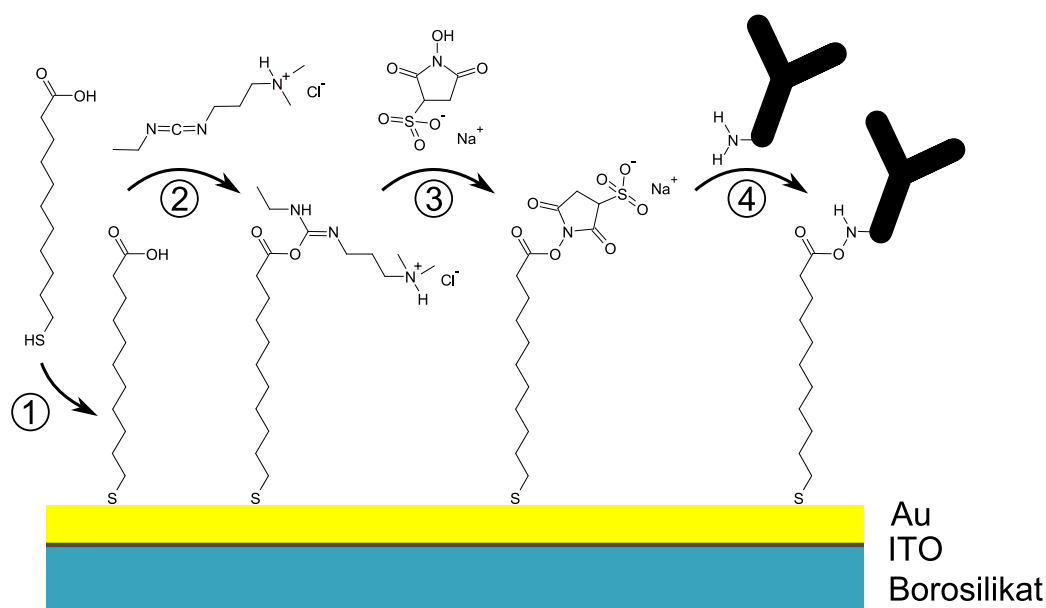


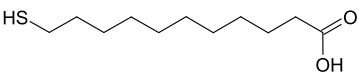
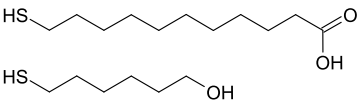
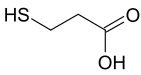
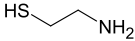
Abbildung 39: Chemoligation von Antikörpern als biologische Erkennungselemente an Carboxyalkanthiole. (1) Die Carboxyalkanthiole (z. B. 11-Mercaptoundekansäure) bildeten durch Chemisorption eine sich selbst-organisierende Monoschicht (SAM) auf den Goldarbeits Elektroden. (2)/(3) Die Carboxylgruppen der Thiole wurden mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) aktiviert. (4) Die NHS-Ester reagierten mit primären Aminen (z. B. von Antikörpern) unter Ausbildung von Amidbindungen.

4.6.1 Aufbau von sich selbst-organisierenden Monoschichten (SAMs) aus Thiolen

Für den Aufbau von SAMs auf den Goldarbeits Elektroden wurden verschiedene Thiole bzw. Thiolkombinationen getestet (Tab. 13). So wurde 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) allein und in Kombination mit 6-Mercaptohexanol (MHO) (1:9 Mischung in Ethanol) verwendet. Das Thiol 3-Mercaptopropionsäure (MPA) wurde sowohl in Ethanol als auch in Reinstwasser gelöst getestet und Cysteamin, eine Thiol- und eine Aminogruppe tragend, wurde in Reinstwasser gelöst eingesetzt.

Mittels CV- und Impedanzmessungen wurden die Elektrodenoberflächen nach der 18-stündigen Thiolmodifikation charakterisiert und Unterschiede zwischen den verschiedenen Thiolen bestimmt. Für Messungen über einen Zeitraum von mehreren Tagen bzw. für eine Produktion auf Vorrat müssen die Molekülschichten auf den Arbeitselektroden in ihrer Zusammensetzung und biologischen Aktivität stabil bleiben. Um dies zu überprüfen wurde die Impedanz der Elektroden vor der Modifizierung, direkt nach der Herstellung der SAMs und nach weiteren 24 und 48 h Lagerung in PBS gemessen.

Tabelle 13: Struktur und Eigenschaften der eingesetzten Thiole. Aufgeführt sind die Struktur der eingesetzten Thiole bzw. Thiolkombinationen, die Anzahl der Kohlenstoffatome (C-Atome), das verwendete Lösungsmittel und die verwendete Abkürzung.

Thiol/-kombination	C-Atome	Lösungsmittel	Abkürzung
11-Mercaptoundekansäure 	11	Ethanol	MUDA
11-Mercaptoundekansäure/ 6-Mercaptohexanol (1:9) 	11/6	Ethanol	MUDA/MHO
3-Mercaptopropionsäure 	3	Ethanol Reinstwasser	MPA/Ethanol MPA/Wasser
Cysteamin 	2	Reinstwasser	Cysteamin

4.6.1.1 Zykelvoltammetrie

Die zykelvoltammetrischen Eigenschaften der Elektroden wurden vor und nach der Thiolmodifikation verglichen. CV-Messungen wurden dafür in 0,5 M KCl und 5 mM Ferri-/Ferrocyanid durchgeführt. Das Potential an der Arbeitselektrode wurde linear zwischen -0,01 und 0,45 V

mit einer Scanrate von 0,1 V/s und einer Stufenhöhe von 5 mV verändert und die resultierende Stromstärke gemessen.

Die Zyklovoltammogramme der mit MPA/Ethanol, MPA/Wasser und Cysteamin inkubierten Elektroden unterschieden sich nur geringfügig von den Zyklovoltammogrammen der entsprechenden sauberen Elektroden (Abb. 40). Die Peakstromstärken für die Oxidation $I_{p,a}$ und die Reduktion $I_{p,k}$ von Ferri-/Ferrocyanid betrugen ca. 30 bzw. - 30 μA . Die Peakseparationen beliefen sich sowohl für die sauberen Elektroden als auch für die Elektroden nach Inkubation mit Cysteamin auf ca. 80 mV. Für die Elektroden mit MPA-SAM war die Peakseparation im Vergleich dazu auf ca. 100 mV erhöht. In den Zyklovoltammogrammen der Elektroden nach Inkubation mit MUDA und MUDA/MHO wurden hingegen keine Stromstärkepeaks detektiert. Ein faradayscher Stromanteil war nicht oder nur gering vorhanden. Lediglich der kapazitive Stromanteil wurde gemessen. Das deutete auf eine Hemmung der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid durch den MUDA- bzw. MUDA/MHO-SAM hin.

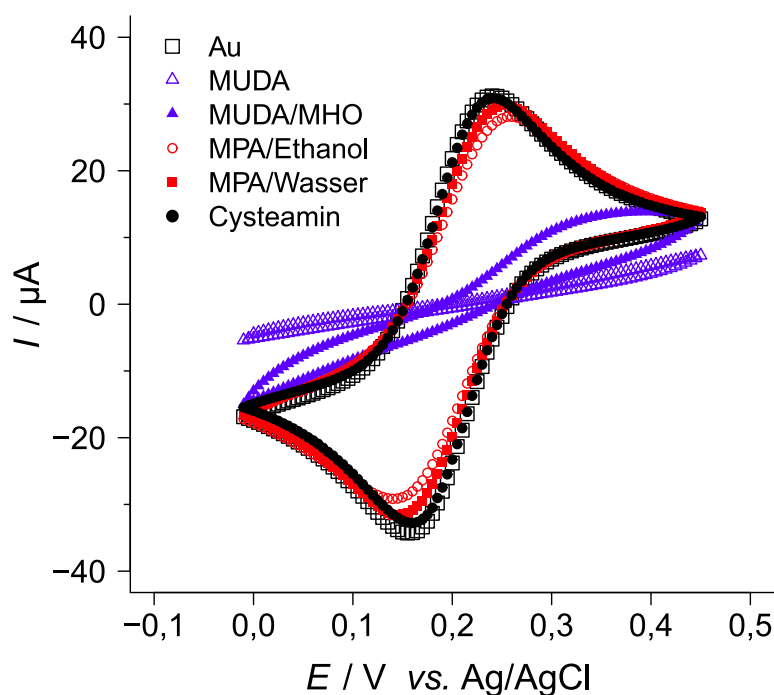


Abbildung 40: Zyklovoltammogramme der sauberen Elektroden und der Elektroden nach Inkubation mit verschiedenen Thiolen. Jeder Datenpunkt der Zyklovoltammogramme ist ein Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens sechs Elektroden. Die Standardabweichungen sind der Übersichtlichkeit halber nicht eingezeichnet. Für MUDA und MUDA/MHO waren keine Stromstärkepeaks erkennbar. Für die anderen SAMs (MPA/Ethanol, MPA/Wasser und Cysteamin) wurden Zyklovoltammogramme gemessen, die mit denen der nicht modifizierten Goldarbeits Elektroden (Au) vergleichbar waren. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,5 M KCl.

Da sich nach Inkubation mit MUDA oder MUDA/MHO und auch nach 48 h Lagerung der Elektroden in PBS keine Stromstärkepeaks detektieren ließen, konnten diese Elektroden mittels CV-Messungen nicht weiter untersucht werden. Die Sensitivität der CV-Messungen war dafür nicht ausreichend.

4.6.1.2 Impedanzspektroskopie

Impedanzspektren wurden sowohl von sauberen Elektroden als auch von denselben Elektroden nach der 18-stündigen Inkubation mit Thiolen und nach 24 und 48 h Lagerung in PBS aufgezeichnet. Gemessen wurde zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential. Die Messdaten wurden mit einem abgewandelten Randles-Modell^[80] $((R_{ct} || CPE) - R_s)$ angepasst und die Impedanzparameter bestimmt. Als Kriterium für die Einschätzung der Stabilität der SAMs diente der Ladungstransferwiderstand R_{ct} .

In Abb. 41 sind die Ergebnisse für den R_{ct} dargestellt. Nach 18-stündiger Inkubation mit 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) wurde ein Wert für R_{ct} von $89,0 \pm 26,3 \text{ k}\Omega$ gemessen (Tab. 14). Verglichen mit ca. $50 \text{ }\Omega$ für eine saubere Elektrode war dies ein enormer Anstieg. Der Ladungstransfer der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid war demnach durch den Aufbau eines SAMs aus MUDA gehemmt. Nach Lagerung in PBS für 24 h bei 4°C hatte sich der Wert des R_{ct} verdoppelt, was auf eine stärkere Ordnung der Thiolmoleküle schließen ließ. Eine stärkere Ordnung bzw. Packungsdichte verringert die Durchlässigkeit des SAMs für Ladungsträger und erhöht somit den R_{ct} . Nach weiteren 24 h bei 4°C konnte keine signifikante Änderung mehr beobachtet werden (48 h im Vergleich zu 24 h, Abb. 41A).

Tabelle 14: Impedanzparameter R_{ct} von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs. Die R_{ct} -Werte wurden für die sauberen Elektroden bestimmt und für die Elektroden nach Modifizierung mit den Thiolen, direkt nach der 18-stündigen Inkubation (0 h) und nach 24 und 48 h Lagerung in PBS. Angegeben sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens drei Elektroden. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,5 M KCl.

Thiole	Au	0 h	24 h	48 h
MUDA	$54 \pm 8 \text{ }\Omega$	$89,0 \pm 26,3 \text{ k}\Omega$	$208,1 \pm 39,8 \text{ k}\Omega$	$248,7 \pm 68,9 \text{ k}\Omega$
MUDA/MHO	$37 \pm 5 \text{ }\Omega$	$11,3 \pm 2,5 \text{ k}\Omega$	$22,2 \pm 2,9 \text{ k}\Omega$	$17,4 \pm 4,4 \text{ k}\Omega$
MPA/Ethanol	$51 \pm 3 \text{ }\Omega$	$770 \pm 143 \text{ }\Omega$	$581 \pm 155 \text{ }\Omega$	$145 \pm 18 \text{ }\Omega$
MPA/Wasser	$47 \pm 4 \text{ }\Omega$	$507 \pm 218 \text{ }\Omega$	$300 \pm 134 \text{ }\Omega$	$170 \pm 40 \text{ }\Omega$
Cysteamin	$48 \pm 6 \text{ }\Omega$	$13 \pm 2 \text{ }\Omega$	$17 \pm 1 \text{ }\Omega$	$23 \pm 3 \text{ }\Omega$

Auch nach Inkubation mit einer 1:9 Mischung aus 11-Mercaptoundekansäure und 6-Mercaptohexanol (MUDA/MHO) wurde mit $11,3 \pm 2,5 \text{ k}\Omega$ ein relativ hoher Wert für den

Ladungstransferwiderstand gemessen. Der MUDA/MHO-SAM hemmte den Ladungstransfer allerdings nicht so stark wie der MUDA-SAM. Nach 24 h Lagerung wurde zwar ebenfalls eine Verdopplung des R_{ct} beobachtet, der Wert war aber nach 48 h Lagerung wieder gesunken (Abb. 41B).

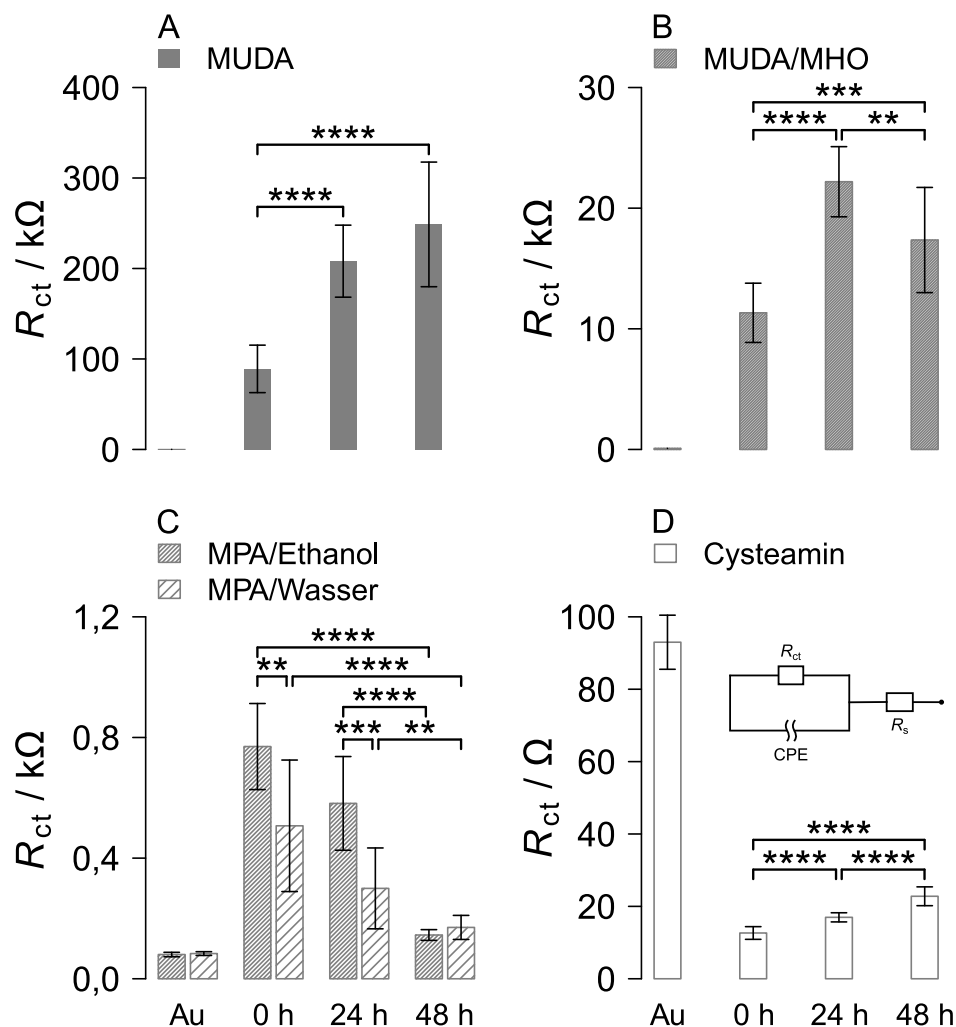


Abbildung 41: Impedanzparameter R_{ct} von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs. Die Elektroden wurden vor (Au) und direkt nach 18 h Inkubation (0 h) mit den verschiedenen Thiolen impedimetrisch mit 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,5 M KCl vermessen. Messungen wurden außerdem nach 24 bzw. 48 h Lagerung in PBS durchgeführt. Mittels Ersatzschaltbild nach Randles^[80] (siehe D) wurden die R_{ct} -Werte für die entsprechenden Thiole und Zeitpunkte ermittelt. Die Balken repräsentieren Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit je mindestens drei Elektroden. Signifikanzen sind mit ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ angegeben.

Die Inkubation mit MPA in Ethanol oder Reinstwasser erhöhte den R_{ct} der Elektroden lediglich auf $770 \pm 143 \Omega$ bzw. $507 \pm 218 \Omega$. Die SAMs aus MPA verringerten somit die

Zugänglichkeit der Elektrode bzw. den Ladungstransfer für die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyamid nur in geringem Maße. Der R_{ct} der mit MPA modifizierten Elektroden sank während der 48-stündigen Lagerung wieder auf $145 \pm 18 \Omega$ bzw. $170 \pm 40 \Omega$ ab (Abb. 41C). Damit unterschied er sich kaum von dem R_{ct} einer sauberen Elektrode mit ca. 50Ω .

Für Elektroden, die 18 h mit Cysteamin inkubiert worden waren, wurde mit $13 \pm 2 \Omega$ ein Wert für den Ladungstransferwiderstand bestimmt, der kleiner war, als der für eine saubere Elektrode (Abb. 41D). Da Cysteamin einen pK_a -Wert von 8,27 besitzt, lag dessen Amino-Gruppe bei einem pH-Wert von ca. 7 in der Messlösung protoniert vor. Die positive Ladung am Cysteamin hatte eine anziehende Wirkung auf die negativ-geladenen Ferri-/Ferrocyamidionen, was in dem geringeren R_{ct} resultierte. Das Überführen in PBS und 48 h Lagerung bei 4°C bewirkten nur eine geringe Steigerung des R_{ct} auf $23 \pm 3 \Omega$.

Der CPE-Parameter A , der als Kapazität interpretiert werden kann (wenn n nahe 1), sank durch Inkubation mit den Thiolen (Tab. 15). Für eine saubere Elektrode betrug A zwischen 7 und $10 \mu\text{Fs}^{n-1}$. Die stärkste Abnahme zeigte sich für Elektroden, die mit MUDA beschichtet worden waren. Hier betrug A nur noch $0,22 \pm 0,02 \mu\text{Fs}^{n-1}$. Danach folgten MUDA/MHO mit $0,30 \pm 0,03 \mu\text{Fs}^{n-1}$, MPA in Ethanol mit $1,15 \pm 0,29 \mu\text{Fs}^{n-1}$, MPA in Reinstwasser mit $1,22 \pm 1,06 \mu\text{Fs}^{n-1}$ und Cysteamin mit $1,74 \pm 0,75 \mu\text{Fs}^{n-1}$. Die Abnahme von A lässt sich damit erklären, dass durch die Formierung der SAMs die Dicke des Dielektrikums an der Elektrode erhöht wurde. Eine Zunahme der Dicke des Dielektrikums verringert die Kapazität bzw. A (siehe Formel 16).

Tabelle 15: Impedanzparameter A von Elektroden mit verschiedenen Thiol-SAMs. Die Werte für den CPE-Parameter A (in μFs^{n-1}) wurden für die sauberen Elektroden bestimmt und für die Elektroden nach Modifizierung mit den Thiolen, direkt nach der 18-stündigen Inkubation (0 h) und nach 24 und 48 h Lagerung in PBS. Angegeben sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens drei Elektroden. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyamid in 0,5 M KCl.

Thiole	Au	0 h	24 h	48 h
MUDA	$7,04 \pm 3,10$	$0,22 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,03$
MUDA/MHO	$6,69 \pm 1,90$	$0,30 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,09$
MPA/Ethanol	$10,03 \pm 2,22$	$1,15 \pm 0,29$	$1,18 \pm 0,31$	$2,20 \pm 0,30$
MPA/Wasser	$7,96 \pm 1,79$	$1,22 \pm 1,06$	$1,75 \pm 0,57$	$1,91 \pm 0,40$
Cysteamin	$6,68 \pm 0,59$	$1,74 \pm 0,75$	$3,07 \pm 0,36$	$4,15 \pm 0,65$

Für alle Thiol-SAMs, außer MUDA, nahm A durch 48-stündige Lagerung in PBS wieder zu, vermutlich durch den Abbau oder die Destabilisierung dieser SAMs. Allerdings wurde der Ausgangswert einer sauberen Elektrode nicht wieder erreicht. Für Elektroden mit dem MUDA-SAM sank A über 24 h Lagerung weiter ab auf $0,17 \pm 0,03 \mu\text{Fs}^{n-1}$ und stabilisierte

sich bei diesem Wert. Diese weitere Abnahme lässt auf eine stärkere Ordnung der Thiolmoleküle schließen.

CV- und Impedanzmessungen zeigten gravierende Unterschiede zwischen den Thiol-SAMs. Nach Inkubation mit den langkettigen Thiolen MUDA oder MUDA/MHO waren in den Zyklovoltammogrammen keine Stromstärkepeaks mehr identifizierbar, der Impedanzparameter R_{ct} war um drei Zehnerpotenzen erhöht und A betrug nur noch ca. 5 % des Wertes der sauberen Elektroden. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanoan an den Elektroden durch die MUDA- bzw. MUDA/MHO-SAMs gehemmt war. Dabei dürften sowohl die Packungsdichte der Moleküle, als auch die negativen Ladungen der Carboxylgruppen der Thiolmoleküle relevant gewesen sein. Die kurzkettigen Thiole MPA und Cysteamin bewirkten hingegen nur geringere Änderungen der elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden.

Durch 48-stündige Lagerung in PBS änderten sich die Impedanzparameter R_{ct} und A für die mit den Thiolen modifizierten Elektroden. Für MPA in Reinstwasser oder Ethanol und MUDA/MHO sank der R_{ct} und A nahm zu, was auf eine Störung oder einen Abbau der SAMs hindeutete. Für Cysteamin näherten sich die Messwerte für R_{ct} und A mit der Dauer der Lagerung wieder den Werten von sauberen Elektroden an. Cysteamin wirkte durch seine in der Messlösung positiv-geladenen Amingruppe anziehend auf die negativen Redoxionen, wodurch der Ladungstransferwiderstand einer mit Cysteamin modifizierten Elektrode geringer war als der einer sauberen Elektrode (Tab. 14). Ein Anstieg des R_{ct} für den Cysteamin-SAM über 48 h Lagerung war also ebenfalls ein Zeichen für den Abbau des SAM. Nur für die Elektroden, die mit MUDA inkubiert worden waren, wurde keine Destabilisierung des SAM, sondern sogar eine Erhöhung der Ordnung beobachtet. Der R_{ct} stieg weiter an und A nahm weiter ab. Nach 24 h war der MUDA-SAM stabil, R_{ct} und A änderten sich durch die weitere Lagerung in PBS nicht mehr.

Mit allen Thiolen wurde demnach eine Änderung der Impedanzparameter R_{ct} und A durch Lagerung der mit ihnen modifizierten Elektrodenarraychips gemessen. Mit MUDA nahm die Stabilität der SAMs zu, mit den anderen getesteten Thiolen ab. Um vergleichbare Messwerte für die Biosensorentwicklung zu gewährleisten, war daher das Mitführen von entsprechenden Kontrollen notwendig, außerdem wurden teilweise Normierungen auf bestimmte Zeitpunkte durchgeführt. Sie sind im einzelnen Fall angegeben.

4.6.2 Stabilität von kovalent immobilisierten Antikörpern auf MUDA-SAMs

Für die Funktionalität des Biosensors spielte neben der Stabilität des Thiol-SAMs die des kovalent gebundenen Antikörpers eine entscheidende Rolle. Um die Aktivität gebundener Antikörper nachzuweisen, wurden Antikörper verwendet, an die das Enzym Meerrettichperoxidase

gekoppelt war. Die Antikörper wurden über ihre primären Amine an die Carbonsäurereste der Thiole auf der Oberfläche der Arbeitselektroden gekoppelt (Abb. 39). Dazu wurde zuerst ein Thiol-SAM aus 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) auf der Goldoberfläche gebildet. Danach wurden die Carboxylgruppen der MUDA-Moleküle mittels EDC und NHS aktiviert, um dann primäre Amine der Antikörper kovalent zu binden. Durch eine anschließende Redoxreaktion mit Präzipitatbildung sollte das Vorhandensein von aktiver Peroxidase und somit indirekt das Vorhandensein nativer Antikörper auf dem Sensor detektiert werden. Das verwendete Substrat war 3-Amino-9-ethylcarbazol. Es wird von Peroxidase in leicht saurem pH (pH 5) zu 3-Azo-9-ethylcarbazol oxidiert, während vorhandenes Wasserstoffperoxid reduziert wird (Abb. 14 in 3.6.3). 3-Azo-9-ethylcarbazol ist in Wasser unlöslich und fällt als Präzipitat aus. Die Ablagerung des Präzipitats auf den Arbeitselektroden lässt sich impedimetrisch als Erhöhung des Ladungstransferwiderstands R_{ct} messen, denn das Präzipitat verringert die Zugänglichkeit der Elektrode für den Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid.

Die Aktivität der an den Antikörper gekoppelten Peroxidase wurde direkt nach der Antikörperimmobilisierung auf den Goldarbeitselektroden (0 h) und nach 72 h Lagerung der Elektroden in PBS (4 °C) überprüft. Dazu wurden die Elektroden für 3 min mit einer Reaktionslösung aus 3-Amino-9-ethylcarbazol, Wasserstoffperoxid und Acetatpuffer (pH 5) inkubiert. Dann wurden die Elektroden in einer Lösung mit 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl impedimetrisch vermessen. Impedanzspektren wurden zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Bestimmung des R_{ct} aus den Messdaten erfolgte mit einem abgewandelten Randles-Modell^[80] $((R_{ct} || CPE) - R_s)$. Die ermittelten Werte für den Ladungstransferwiderstand nach der Präzipitatbildung ($R_{ct}(\text{POX})$) wurden auf die R_{ct} -Werte der Sensorelektrode mit immobilisierten Antikörpern ($R_{ct}(\text{Sensor})$) normiert (Formel 33). Als Kontrollen dienten Elektroden, die nicht mit Antikörpern behandelt worden waren.

$$\Delta R_{ct} = \frac{R_{ct}(\text{POX}) - R_{ct}(\text{Sensor})}{R_{ct}(\text{Sensor})} \cdot 100 \% \quad (33)$$

Direkt nach der Immobilisierung der Antikörper-Peroxidase-Konjugate und der dreiminütigen Präzipitatbildung wurden relative Änderungen des R_{ct} bestimmt, die verglichen mit den Kontrollen ohne Antikörper, mehr als doppelt so groß waren (Abb. 42). ΔR_{ct} betrug für die Elektroden mit Antikörpern $345 \pm 75 \%$ und für die Kontrollen ohne Antikörper nur $142 \pm 45 \%$. Demnach waren Antikörper mit katalytisch aktiver Peroxidase auf den Elektroden immobilisiert. Die katalytische Aktivität der Peroxidase ließ vermuten, dass sich auch die Antikörper in einem biologisch aktiven Zustand befanden.

Die modifizierten Elektroden mit den Antikörper-Peroxidase-Konjugaten wurden für 72 h in PBS bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurde erneut für 3 min mit der Reaktionslösung für die

Präzipitatfällung inkubiert und durch Impedanzmessung die relative Änderungen des R_{ct} bestimmt. ΔR_{ct} betrug für die Elektroden mit Antikörpern nach 72 h Lagerung ca. 707 ± 203 % und war damit im Vergleich zu dem Wert für ΔR_{ct} direkt nach der Immobilisierung der Antikörper doppelt so groß. Dafür war die relative Änderung des R_{ct} der Kontrollelektroden ohne Antikörper nach 72 h mit 45 ± 33 % um zwei Drittel geringer als vor der Lagerung (0 h). Es befand sich somit auch nach 72 h Lagerung aktive Peroxidase auf den Elektroden, was auf native, immobilisierte Antikörper schließen ließ. Eine Verminderung der Peroxidaseaktivität, respektive der Antikörperstabilität, wurde nicht beobachtet. Die relative Änderung des Ladungstransferwiderstands nahm sogar im Vergleich zur Messung direkt nach der Modifizierung der Elektroden zu, möglicherweise durch die Äquilibration der Peroxidasemoleküle im neuen Medium (PBS). Dass auch für die Kontrollen eine Änderung des R_{ct} bezogen auf die hergestellte Sensorelektrode gemessen wurde, spricht für das ständige Mitführen von Kontrollen.

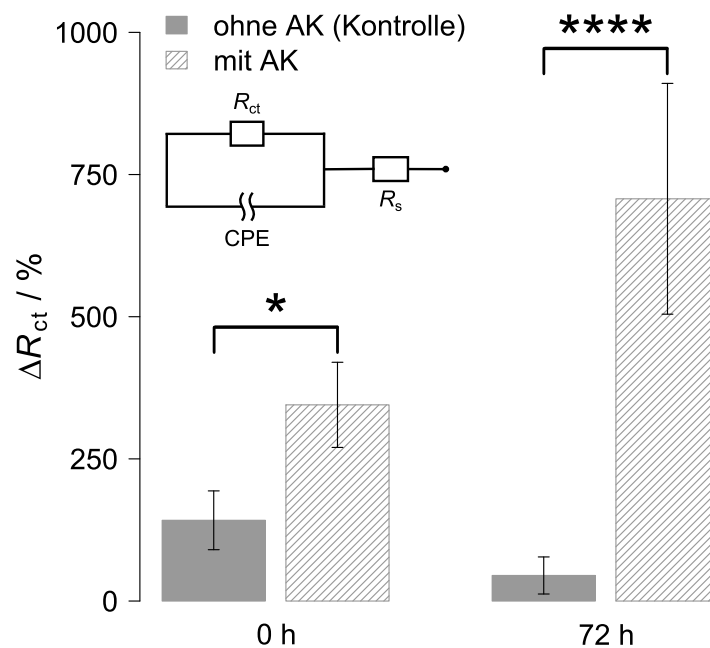


Abbildung 42: Stabilität des Antikörper-Peroxidase-Konjugats auf den mit MUDA beschichteten Elektroden. Dargestellt ist die relative Änderung von R_{ct} (ΔR_{ct} , siehe Formel 33) nach der von der Meerrettichperoxidase katalysierten, dreiminütigen Präzipitatfällung zu 0 und 72 h Lagerung der Elektroden in PBS. Jeder Balken entspricht einem Mittelwert \pm der Standardabweichung aus Daten eines Versuches mit mindestens 3 Elektroden. Die Signifikanzen sind mit * $p < 0,05$ und **** $p < 0,0001$ angegeben. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyano in 0,5 M KCl (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

4.7 Biosensorische Detektion von Tenascin C

Auf Basis der 9WPtE-Elektrodenarraychips wurden Biosensoren zur elektrochemischen Detektion von Tenascin C (TnC) entwickelt. TnC ist ein Protein der extrazellulären Matrix, welches im Menschen vornehmlich während der embryonalen Entwicklung exprimiert wird. Eine Ausnahme bilden Tumorgewebe. Hier wird TnC auch im adulten Status exprimiert. Aus diesem Grund wird TnC als potentieller Tumormarker betrachtet (siehe 1.6).

Das Prinzip der angestrebten Biosensoren bestand darin TnC aus einer Probenlösung zu binden und diese Bindung in ein elektrisches Signal umzuwandeln, welches dann interpretiert werden konnte. Dafür wurden verschiedene Ansätze gewählt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

4.7.1 Indirekte Detektion von Tenascin C

Der erste Ansatz zur biosensorischen Detektion von Tenascin C war ein indirekte Verfahren (Abb. 43A). Dabei wurde das Antigen, humanes TnC (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), mittels Thiolchemie auf den Goldarbeitselektroden der Elektrodenarraychips immobilisiert. Als Thiol wurde 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) verwendet. Nach Formierung eines MUDA-SAMs auf den Arbeitselektroden der Elektrodenarraychips wurden die Carboxylgruppen der MUDA-Moleküle mittels EDC und NHS aktiviert, um dann die primären Amine der TnC-Proteine kovalent zu binden. Nach einstündiger Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Rinderserumalbumin (BSA, 3 % w/v) wurden die für TnC spezifischen Antikörper zugegeben (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Sie banden an das immobilisierte TnC. Danach wurden die Elektroden mit Sekundärantikörpern inkubiert (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die ihrerseits die primären anti-TnC-Antikörper erkannten. An die Sekundärantikörper waren Peroxidasemoleküle gekoppelt, die unter sauren Bedingungen (pH 5) bei Zugabe von 3-Amino-9-ethylcarbazol und Wasserstoffperoxid die Bildung des Präzipitats 3-Azo-9-ethylcarbazol katalysierten. Das Präzipitat verringerte die Zugänglichkeit der Elektrode für das Redoxpaar Ferri-/Ferrocyanid, was impedimetrisch nachgewiesen werden konnte. Die fünfminütige Präzipitatisfällung diente somit als Signalverstärkung für die Bindung der Antikörper an TnC. Als Kontrollen wurden Elektroden mitgeführt, bei denen entweder auf TnC oder auf den primären Antikörper verzichtet wurde. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte des indirekten Detektionsverfahrens ist in Kapitel 3.7.1 gegeben.

Impedanzspektren wurden nach allen Inkubationsschritten zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Mit Hilfe des abgewandelten Randles-Modells^[80] bestehend aus Ladungstransferwiderstand R_{ct} , konstantem Phasenelement (CPE) und Lösungsmittelwiderstand R_{s} ($(R_{\text{ct}}||\text{CPE}) - R_{\text{s}}$) wurden die

Impedanzparameter bestimmen. Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} korreliert mit der Zugänglichkeit der Elektrode. Daher wurde die relative Änderung dieses Impedanzparameters (ΔR_{ct}) als Kriterium zum Nachweis der Präzipitatablagerung und somit zur Detektion von TnC herangezogen. ΔR_{ct} wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta R_{ct} = \frac{R_{ct}(\text{POX}) - R_{ct}(\text{MUDA})}{R_{ct}(\text{MUDA})} \cdot 100 \% \quad (34)$$

Hierbei ist $R_{ct}(\text{POX})$ der Ladungstransferwiderstand der Elektrode nach der Präzipitattfällung katalysiert durch die Peroxidase und $R_{ct}(\text{MUDA})$ der Ladungstransferwiderstand der Elektrode nach dem Aufbau des MUDA-SAMs.

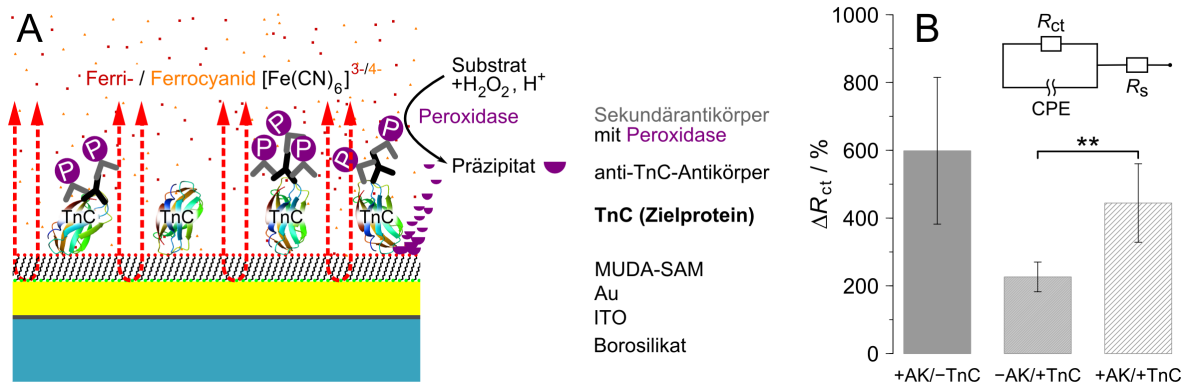


Abbildung 43: Indirekte biosensorische Detektion von Tenascin C (TnC). A: Prinzip des Biosensors zur indirekten Detektion von TnC. An den MUDA-SAM wurden TnC-Proteine kovalent gebunden. Nach Inkubation mit anti-TnC-Antikörpern (schwarz) und entsprechenden Sekundärantikörpern (dunkelgrau) erfolgte die Signalverstärkung über eine Präzipitattfällung. Diese wurde durch Peroxidase (P, lila) katalysiert, welche an die Sekundärantikörper gekoppelt war. B: Mit dem indirekten Verfahren zur Detektion von TnC wurden nur geringe Unterschiede in der relativen Änderung des Ladungstransferwiderstands (ΔR_{ct}) nach fünfminütiger Präzipitattfällung zwischen dem Ansatz mit TnC und Antikörpern (+AK / +TnC) und den Kontrollen ohne TnC (+AK / -TnC) bzw. ohne Primärantikörper (-AK / +TnC) bestimmt. Gemessen wurde die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl. Die Balken stellen Mittelwerte ± die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten dar. Die Signifikanz ist mit ** p < 0,01 angegeben (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Nach fünfminütiger Präzipitattbildung wurde für die Elektroden mit TnC und Antikörpern eine relative Änderung des R_{ct} von $444 \pm 116 \%$ bestimmt (Abb. 43B). Für die Kontrollelektroden ohne TnC wurde allerdings ein ähnlich großer ΔR_{ct} -Wert gemessen ($599 \pm 216 \%$). Eine Ursache könnte die unspezifische Bindung der Primärantikörper an die Elektroden gewesen sein. Die Kontrollelektroden ohne den primären Antikörper unterschieden sich mit einem ΔR_{ct} -Wert von $226 \pm 44 \%$ signifikant von den Elektroden mit TnC und Antikörpern. Der relative Anstieg des R_{ct} für diese Kontrollelektroden ohne primären Antikörper war vermut-

lich durch unspezifische Bindung der Sekundärantikörper an die Elektroden hervorgerufen. Die Spezifität der TnC-Detektion war im indirekten Verfahren nicht ausreichend, weswegen andere Verfahren getestet wurden.

4.7.2 Sandwich-Verfahren zur Detektion von Tenascin C

In einem zweiten Ansatz zur elektrochemischen Detektion von Tenascin C wurde ein *sandwich*-Verfahren verwendet (Abb. 44A). Dazu wurde nicht das Antigen TnC auf dem MUDASAM der Arbeitselektroden immobilisiert, sondern anti-TnC-Antikörper als biologische Erkennungsmoleküle. Nach 30 min Inkubation mit 1 % BSA (w/v) in PBS wurde TnC in einer Konzentration von 10 µg/ml für 1 h auf den Elektroden inkubiert. Im Anschluss wurde für 1 h mit weiteren anti-TnC-Antikörpern (10 µg/ml) inkubiert. Diese unterschieden sich in ihrem Epitop von den ersten Primärantikörpern auf der Elektrode. Zu diesem *sandwich* aus erstem anti-TnC-Antikörper, TnC und zweitem anti-TnC-Antikörper wurden Sekundärantikörper zugeführt, die lediglich an die zweiten anti-TnC-Antikörper banden (10 µg/ml, 1 h Inkubation). An diese Sekundärantikörper war Peroxidase gekoppelt. Das Enzym wurde erneut verwendet, um durch eine Präzipitatbildung TnC impedimetrisch nachzuweisen. Als Kontrollen wurden Elektroden mitgeführt, bei denen entweder auf TnC oder auf den zweiten anti-TnC-Antikörper verzichtet wurde. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte des *sandwich*-Detektionsverfahrens befindet sich in Kapitel 3.7.2.

Impedanzmessungen wurden nach allen Inkubationsschritten zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential durchgeführt. Die Messdaten wurden anhand eines abgewandelten Randles-Modells^[80] $((R_{ct} || CPE) - R_s)$ ausgewertet. Die relative Änderung des Ladungstransferwiderstands ΔR_{ct} , die mit der Zugänglichkeit der Elektrode korreliert, diente dem Nachweis der Präzipitatablagerung und somit der Detektion von TnC. ΔR_{ct} wurde analog der Formel 34 berechnet.

In Abb. 44B sind die Ergebnisse des *sandwich*-Verfahrens zur Detektion von TnC dargestellt. Für die Elektroden mit TnC und Antikörpern wurde nach der fünfminütigen Präzipitatisfällung ein ca. doppelt so großer ΔR_{ct} -Wert bestimmt (1091 ± 235 %) wie für die Kontrollen ohne TnC (654 ± 195 %) und die Kontrollen ohne den zweiten Primärantikörper (459 ± 192 %). Damit lag das Signalverhältnis zwischen den Elektroden mit TnC und Antikörpern und den Kontrollelektroden bei 2:1. Als Ursache für den Anstieg des R_{ct} bei den Kontrollelektroden nach der Präzipitatisfällung wird die unspezifische Bindung der zweiten anti-TnC-Antikörper bzw. der Sekundärantikörper angenommen.

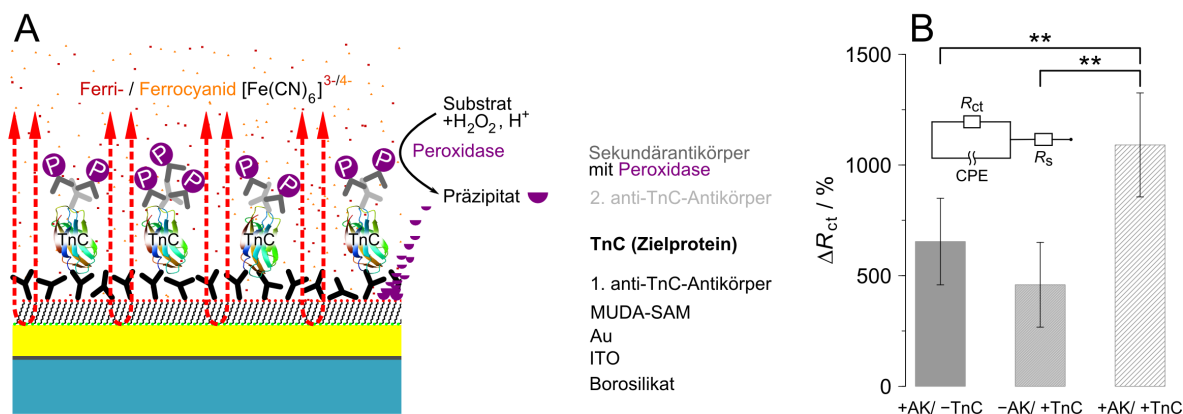


Abbildung 44: Sandwich-Verfahren zur biosensorischen Detektion von Tenascin C. **A:** Prinzip des Biosensors zur Detektion von TnC im *sandwich*-Verfahren. An den MUDA-SAM wurden anti-TnC-Antikörper (schwarz) kovalent gebunden. Nach Inkubation mit der TnC-Probe, bzw. der Kontrollprobe ohne TnC, wurden weitere anti-TnC-Antikörper mit anderem Epitop zugegeben (hellgrau). Anschließend wurde noch mit Sekundärantikörpern (dunkelgrau) gegen den zweiten anti-TnC-Antikörper inkubiert. Dann erfolgte eine Signalverstärkung über eine Präzipitattfällung. Diese wurde durch Peroxidase (P, lila) katalysiert, welche an die Sekundärantikörper gekoppelt war. **B:** Mit dem *sandwich*-Verfahren wurde ein Verhältnis der ΔR_{ct} -Werte nach fünfminütiger Präzipitattfällung von 2:1 zwischen den Elektroden mit TnC und Antikörpern und den Kontrollelektroden gemessen. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl. Die Balken stellen Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils mindestens drei Elektroden dar. Signifikanzen sind mit ** $p < 0,01$ angegeben (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

4.7.3 Kompetitive biosensorische Detektion von Tenascin C

Zur Erhöhung der Spezifität der biosensorischen Detektion von Tenascin C wurde noch ein kompetitives Verfahren getestet (Abb. 45A). Dabei wurden ebenfalls anti-TnC-Antikörper auf MUDA-SAMs immobilisiert. Die hergestellten Biosensoren wurden für 1 h mit TnC in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inkubiert. Im Anschluss wurden Sekundärantikörper (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit Peroxidase zugegeben und für 30 min auf den Elektroden belassen. Die Sekundärantikörper erkannten spezifisch die primären anti-TnC-Antikörper am MUDA-SAM. Gebundenes TnC verminderte allerdings die Zugänglichkeit der Primärantikörper für die Sekundärantikörper, wodurch sich auch weniger Peroxidasemoleküle auf der Elektrode befanden. Die Konzentration an Peroxidase bestimmte die Geschwindigkeit mit der das Präzipitat 3-Azo-9-ethylcarbazol gebildet wurde. Die Fällungsreaktion wurde nach 3 min gestoppt und die Elektroden impedimetrisch vermessen. Da der Bedeckungsgrad einer Elektrode Einfluss auf deren Impedanzverhalten hat, konnten indirekt Rückschlüsse auf die Menge an gebildetem Präzipitat und somit auf die Menge an gebundenem TnC gezogen werden. Als Kontrollen dienten zum einen Elektroden, die nicht mit TnC sondern nur mit Puffer inkubiert wurden und zum anderen Elektroden, die statt mit TnC mit äquimolaren Mengen Rinderserumalbumin

min (BSA) inkubiert wurden. Die BSA Kontrollen wurden mitgeführt, um ein unspezifisches Binden von TnC an die anti-TnC-Antikörper auszuschließen. Eine ausführliche Beschreibung der einzelnen Schritte des kompetitiven Detektionsverfahrens wird in Kapitel 3.7.3 gegeben.

Impedanzspektren wurden nach allen Inkubationsschritten zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanoide und 0,5 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit einem abgewandelten Randles-Ersatzschaltbild^[80] $((R_{ct} || CPE) - R_s)$ ausgewertet (Abb. 45B). Die Änderung des Ladungstransferwiderstands R_{ct} , die mit der Zugänglichkeit der Elektrode korreliert, diente dem Nachweis von TnC. Je größer R_{ct} , desto mehr Präzipitat hatte sich abgelagert und desto mehr Sekundärantikörper hatte gebunden. Eine größere Menge an gebundenem Sekundärantikörper ließ wiederum auf eine geringe Menge an gebundenem TnC schließen. Eine Normierung des R_{ct} war für den kompetitiven Ansatz nicht nötig.

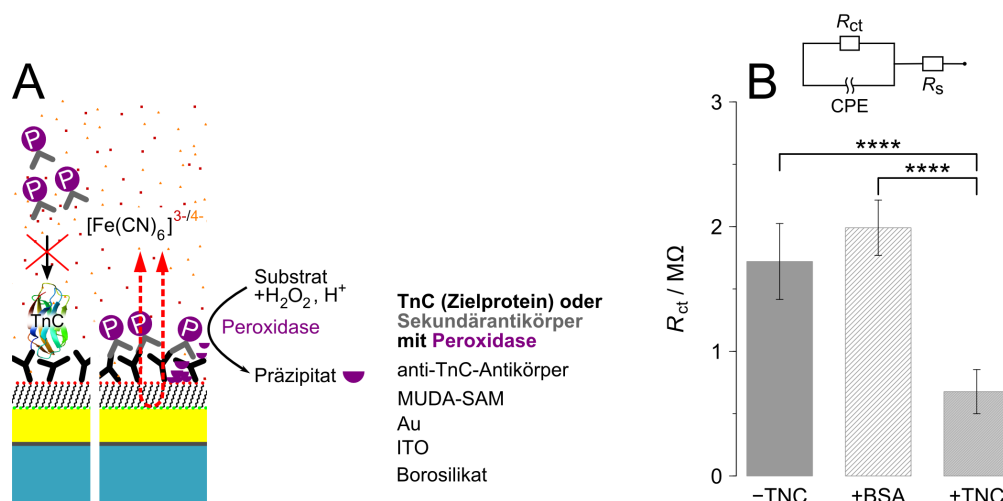


Abbildung 45: Kompetitives Verfahren zur biosensorischen Detektion von Tenascin C.
A: Prinzip des Biosensors zur Detektion von TnC mit einem kompetitiven Verfahren. An den MUDA-SAM wurden anti-TnC-Antikörper (schwarz) kovalent gebunden. Nach Inkubation mit der TnC-Probe (links), bzw. der Kontrollprobe ohne TnC (rechts), wurden Sekundärantikörper (dunkelgrau) gegen die anti-TnC-Antikörper zugegeben. Dann erfolgte eine dreiminütige Präzipitatzufällung katalysiert durch Peroxidase (P, lila), welche an die Sekundärantikörper gekoppelt war. TnC in der Probe (links) minderte die Bindung von Sekundärantikörpern, was mit einer geringeren Präzipitatzufällung einherging.
B: Mit dem kompetitiven Biosensor wurde ein Signalverhältnis zwischen den Elektroden mit TnC und Antikörpern (+ TnC) und den Kontrollen ohne TnC (– TnC) bzw. mit äquimolarer Konzentration an BSA (+ BSA) von ca. 1:3 bestimmt. Gemessen wurde die Impedanz in 5 mM Ferri-/Ferrocyanoide und 0,5 M KCl. Die Balken stellen Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten dar. Signifikanzen sind mit **** $p < 0,0001$ angegeben (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Für die Elektroden mit TnC und Antikörpern wurde nach der Präzipitatzufällung ein R_{ct} -Wert von 676 ± 177 k Ω gemessen (Abb. 45B). Im Gegensatz dazu lag der R_{ct} für die Kontrollen fast

dreimal so hoch. Die Vermessung der Kontrollelektroden mit Puffer statt TnC ergab einen Wert von $1720 \pm 304 \text{ k}\Omega$. Die Kontrollen mit Rinderserumalbumin (BSA) in äquimolaren Mengen ($100 \text{ }\mu\text{g/ml}$) unterschieden sich in ihrem R_{ct} -Wert ($1991 \pm 222 \text{ k}\Omega$) nicht signifikant vom Wert für die Kontrollen mit Puffer. Ein unspezifisches Binden des BSA wurde also nicht beobachtet.

4.7.3.1 Konzentrationsabhängige Detektion von TnC mit dem kompetitiven Biosensor

Mit dem entwickelten kompetitiven Biosensor sollte TnC auch konzentrationsabhängig nachgewiesen werden. Dazu wurde eine logarithmische Konzentrationsreihe von TnC mit 100, 30, 10, 3 und $1 \text{ }\mu\text{g/ml}$ hergestellt. Die Lösungen wurden auf verschiedenen Elektroden des Biosensors mit immobilisierten anti-TnC-Antikörpern 1 h inkubiert. Dann wurden die Elektroden mit Sekundärantikörpern gegen die Primärantikörper für 30 min inkubiert. Peroxidasemoleküle, gekoppelt an die Sekundärantikörper, katalysierten die Bildung von 3-Azo-9-ethylcarbazol. Die Menge an gebildetem Präzipitat korrelierte mit der Menge an gebundenem TnC und somit der eingesetzten TnC-Konzentration.

Impedanzspektren wurden wiederum zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit einem Randles-Ersatzschaltbild^[80] $((R_{\text{ct}}||\text{CPE}) - R_s)$, das in Abb. 46B dargestellt ist. Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} , der von der Zugänglichkeit der Elektrode abhängt, diente als Parameter für den TnC-Nachweis. Je größer R_{ct} , desto mehr Präzipitat und somit auch desto mehr Sekundärantikörper befanden sich auf den Elektroden. Eine größere Menge an gebundenem Sekundärantikörper ließ wiederum auf eine geringe Menge an gebundenem TnC und somit auf eine geringe Konzentration an TnC in der Probe schließen.

Das Ergebnis der konzentrationsabhängigen TnC-Detektion ist in Abb. 46A zu sehen. Die Datenpunkte wurden nicht-linear angepasst und eine TnC-Detektionsgrenze von $7 \text{ }\mu\text{g/ml}$ bestimmt. Unter Beachtung, dass die Arbeitselektroden nur mit $2 \text{ }\mu\text{l}$ TnC-Probe benetzt wurden, konnten mit dem kompetitiven Biosensor 14 ng TnC detektiert werden, was 48 fmol der monomeren TnC-Form entsprach. Als Beleg der Wiederverwendbarkeit der Elektrodenarraychips wurde die Reproduzierbarkeit der R_{ct} -Werte nach Inkubation mit $100 \text{ }\mu\text{g/ml}$ TnC, und Präzipitattfällung untersucht (Abb. 46B). Für neue Elektroden mit 0 bis 3 Nutzungen wurde ein Wert von $466 \pm 126 \text{ k}\Omega$ gemessen und für Elektroden mit 15-20 Nutzungen ein R_{ct} von $533 \pm 80 \text{ k}\Omega$ (je drei unabhängige Experimente). Die Signalstärke wurde durch das Recyclen der Elektroden folglich nicht gemindert.

Um die Detektionsgrenze des kompetitiven TnC-Biosensors mit herkömmlichen biochemischen Techniken zu vergleichen, wurden parallel *Dot Blots* angefertigt (siehe 3.1.3.2). Die TnC-Konzentrationsreihe wurde dabei auf eine PVDF-Membran übertragen, jeweils $2 \text{ }\mu\text{l}$ von

jeder Konzentration, vergleichbar mit der Situation im Biosensor. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit Magermilch blockiert und mit dem anti-TnC-Primärantikörper über Nacht inkubiert. Als Primärantikörper wurde derselbe Antikörper verwendet, der im kompetitiven biosensorischen Verfahren zum Einsatz kam. Die Inkubationszeit für den Sekundärantikörper, ebenfalls derselbe wie im biosensorischen Verfahren, betrug 2 h. Zum Schluss wurden die Antikörper, die an das TnC gebunden hatten, mittels Chemilumineszenzdetektion sichtbar gemacht.

Auf dem entwickelten *Dot Blot* konnten lumineszierende Flecken nur bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml beobachtet werden (Abb. 47). Das Detektionslimit lag, vergleichbar mit dem des kompetitiven Biosensors, zwischen 3 und 10 µg/ml TnC.

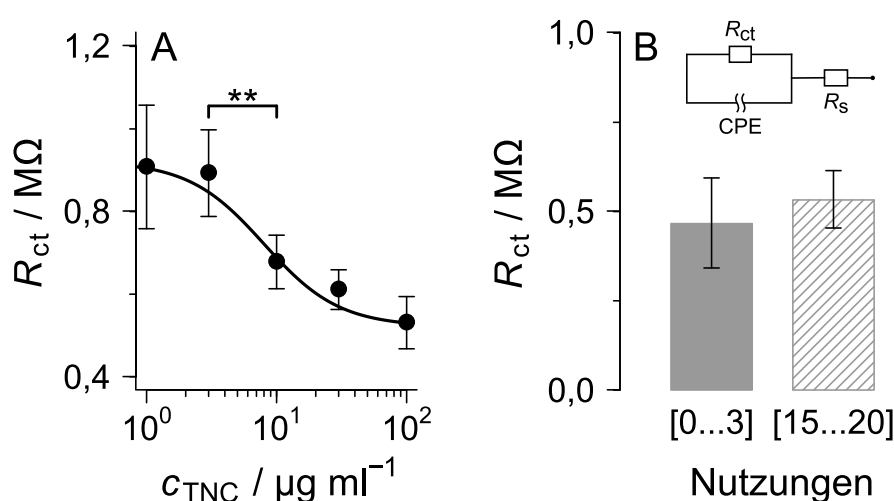


Abbildung 46: Impedanzmessungen zur konzentrationsabhängigen kompetitiven Detektion von Tenascin C. **A:** Die TnC-Detektionsgrenze wurde durch nicht-lineare Anpassung (eingefügte Kurve) mit 7 µg/ml bestimmt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von mindestens drei Elektroden aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ist mit ** $p < 0,01$ angegeben. **B:** Auch nach 15-20 Nutzungen bzw. Recyclingzyklen ([15...20]) wurden R_{ct} -Werte gemessen, die mit denen neuer Elektroden (0 bis 3 Mal benutzt, [0...3]) vergleichbar waren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen des R_{ct} von fünf Elektroden aus drei unabhängigen Experimenten nach Inkubation mit 100 µg/ml TnC und einminütiger Präzipitatzfällung. Als Messlösung für **A** und **B** diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,5 M KCl (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Mit dem kompetitiven Biosensor wurde die Spezifität der TnC-Detektion im Vergleich zu den anderen getesteten Verfahren erhöht. Impedimetrisch wurde ein Signalverhältnis von 1:3 zwischen den Elektroden mit TnC und Antikörpern und den Kontrollelektroden gemessen. Wogegen mit dem indirekten und dem *sandwich*-Verfahren maximal ein Signalverhältnis von 2:1 erreicht wurde. Auch ein konzentrationsabhängiger Nachweis von TnC war mit dem kom-

petitiven Sensor möglich. Das Detektionslimit des Biosensors lag bei $7 \mu\text{g/ml}$, vergleichbar mit dem Limit des parallel durchgeführten *Dot Blots*. Zusätzlich wurde die Wiederverwendbarkeit der Elektroden durch konstante Signalstärke über bis zu 20 Nutzungen bzw. Recyclingzyklen bestätigt.

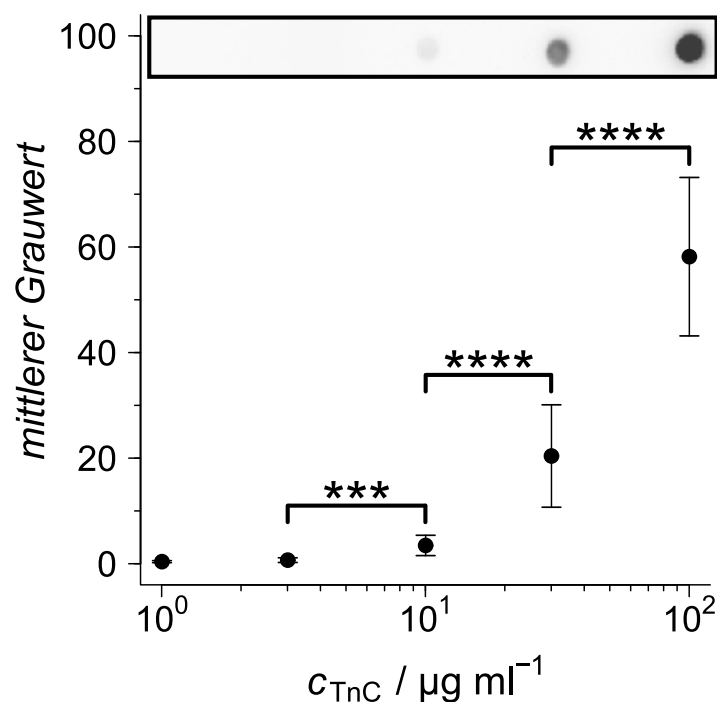


Abbildung 47: Konzentrationsabhängige Detektion von Tenascin C mittels *Dot Blot*. *Dot Blots* wurden mit der TnC-Konzentrationsreihe angefertigt. In den *Blots* und bei Auswertung der mittleren Grauwerte (siehe 3.1.3.2) wurde ein Detektionslimit zwischen 3 und $10 \mu\text{g/ml}$ bestimmt. Die Datenpunkte sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen mit je drei Replikaten. Signifikanzen sind mit *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben.

4.8 Biosensorische Detektion von ganzen Zellen

Neben der Detektion von in Lösung befindlichen Markerproteinen sollte die Möglichkeit der biosensorischen Detektion ganzer Zellen überprüft werden. Die Zellen sollten über ihre spezifischen Oberflächenproteine auf dem Sensor gebunden und die Bindung mittels Impedanzspektroskopie nachgewiesen werden. Als „Fängermoleküle“ sollten wiederum auf der Sensoroberfläche immobilisierte Antikörper dienen.

Die experimentelle Vorgehensweise und die optimalen Versuchsbedingungen wurden zuerst mit einem Modellsystem getestet. Als Zellersatz dienten Polystyrolpartikel. Sie hatten im Mit-

tel einen Durchmesser von $1,84 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Für eukaryotische Zellen läge ein Durchmesser von ca. $2 \mu\text{m}$ an der unteren Grenze des Größenspektrums. Auf den Partikeln waren Antikörper immobilisiert, die durch Immunisierung in Ziegen hergestellt worden waren. An sie war ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der ein Anregungsmaximum von 470-490 nm und ein Emissionsmaximum von 520 nm besaß. Die Ziege-Antikörper wurden als Oberflächenantigene bzw. Markerproteine der Partikel betrachtet. Über diese Antikörper sollten die Partikel auf dem Sensor gebunden werden.

4.8.1 Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip

Das Prinzip der Detektion der Polystyrolpartikel ist in Abb. 48 dargestellt. Auf den Goldarbeitselektroden der Chips wurde ein MUDA-SAM aufgebaut. An diesen wurden anti-Ziege-Antikörper gegen den Ziege-Antikörper der Partikel immobilisiert. Anschließend wurden Suspensionen der Polystyrolpartikel (0,01 mg/ml in PBS, ca. 3 Mio. Partikel/ml) aufgetragen und für 30 min bei 30 rpm (Umdrehungen pro Minute auf dem Taumler) inkubiert. Es wurden drei verschiedene Ansätze getestet: ohne zusätzliches Rinderserumalbumin (BSA, in der Stammlösung schon zu 0,05 % w/v enthalten), mit 0,5 % BSA (w/v) und mit 1 % BSA (w/v). BSA diente dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf den Elektroden. Als Kontrollen wurden Elektroden ohne die anti-Ziege-Antikörper mitgeführt. Nach dem Waschen (drei Mal für 10 min bei 30 rpm) wurden die auf den Elektroden befindlichen fluoreszierenden Partikel mikroskopisch dokumentiert. Außerdem wurden Impedanzmessungen durchgeführt, um die Bindung der Partikel auch elektrochemisch nachzuweisen.

4.8.1.1 Fluoreszenzmikroskopie

Ohne BSA wurde auf den Elektroden mit Antikörpern und auf den Kontrollelektroden ohne Antikörper die gleiche Partikelanzahl pro mm^2 Elektrodenfläche gezählt, 438 ± 44 und 440 ± 62 (Abb. 49). Dass die Partikel auch auf den Elektroden ohne Antikörper in hoher Zahl vorhanden waren, deutete auf unspezifische Bindungen hin. Bei Zusatz von 0,5 % BSA (w/v) wurden auf den Elektroden mit Antikörpern 473 ± 84 Partikel pro mm^2 gezählt. Für die Kontrollen ohne Antikörper waren es nur in etwa die Hälfte (232 ± 95). Bei weiterer Erhöhung der BSA-Konzentration auf 1 % (w/v) belief sich das Verhältnis der Partikelanzahlen der Elektroden mit Antikörpern und der Kontrollelektroden auf 5:1. Auf Elektroden mit Antikörpern wurden im Mittel 513 ± 77 Partikel pro mm^2 gezählt, auf den Kontrollelektroden lediglich 108 ± 82 . Mit steigender BSA-Konzentration sank somit die Anzahl der Partikel auf den Kontrollelektroden, während die Partikelanzahl auf den Elektroden mit Antikörpern relativ konstant blieb. Durch Einsatz von BSA war es möglich unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, um die Spezifität der Partikeldetektion zu erhöhen.

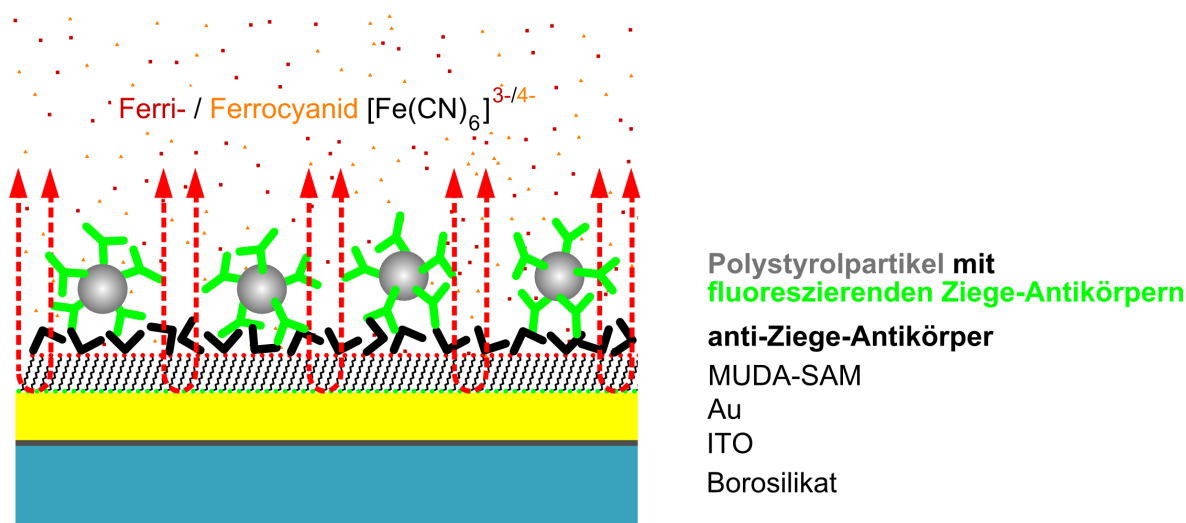


Abbildung 48: Prinzip der biosensorischen Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip. Die Goldarbeits Elektroden der 9WPtE-Chips wurden mit einem MUDA-SAM modifiziert und an diesen SAM wurden anti-Ziege-Antikörper kovalent gebunden. Dann wurden die Biosensoren mit den Polystyrolpartikeln, die ihrerseits Ziege-Antikörper trugen, inkubiert. Der Nachweis der Bindung der Partikel erfolgte mikroskopisch über die Fluoreszenzmarkierung der Partikel und via Impedanzspektroskopie mit dem Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid.

4.8.1.2 Impedanzspektroskopie

Ziel der Arbeit war die Entwicklung von Biosensoren basierend auf elektrochemischer Signalumwandlung. Daher wurde überprüft, ob die mikroskopisch beobachteten Unterschiede in der Partikelanzahl auch impedimetrisch nachgewiesen werden können. Dafür wurden Impedanzspektren zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,1 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit einem abgewandelten Randles-Ersatzschaltbild^[80] $((R_{ct} || \text{CPE}) - R_s)$ ausgewertet (Abb. 50). Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} wurde als Kriterium für den Bedeckungsgrad der Elektroden herangezogen.

Impedimetrisch konnte kein Unterschied zwischen den Elektroden mit Antikörpern und den Kontrollelektroden bei steigender BSA-Konzentration nachgewiesen werden. Für keine BSA-Konzentration unterschied sich der R_{ct} -Wert der Elektroden mit und ohne Antikörper signifikant (Abb. 50). Ohne BSA und mit 0,5 % BSA (w/v) wurden Ladungstransferwiderstände von 0,3 bis 0,4 MΩ erreicht. Für 1 % BSA lag der Wert doppelt so hoch bei 0,7 bis 0,8 MΩ.

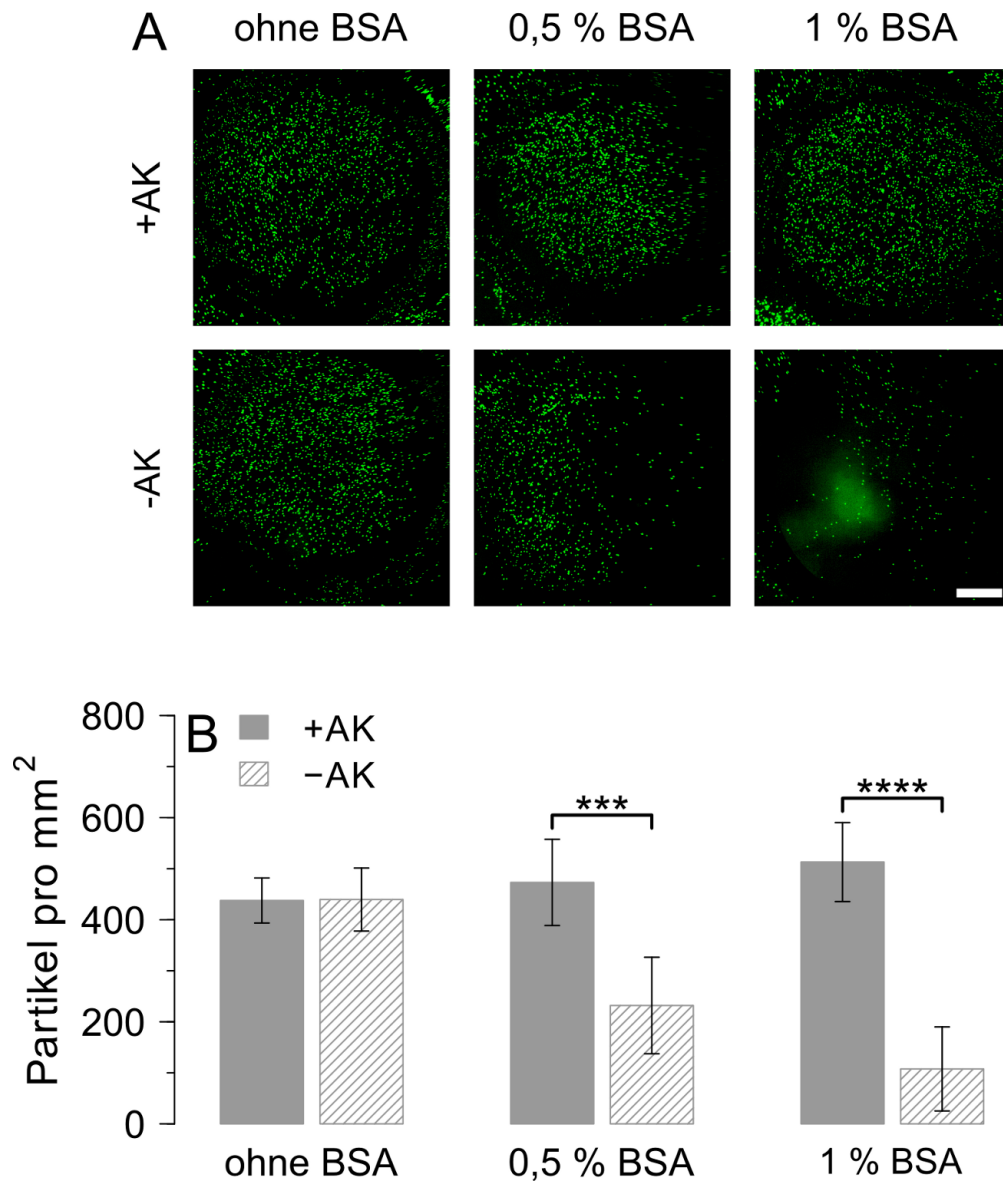


Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Anzahl gebundener Polystyrolpartikel auf dem 9WPtE-Biosensor. **A:** Mit Zunahme der BSA-Konzentration verringerte sich die Partikelanzahl auf den Kontrollelektroden ohne Antikörper (-AK). Auf den Elektroden mit Antikörpern (+AK) wurde für alle drei BSA-Konzentrationen eine vergleichbare Partikelanzahl beobachtet (Maßstab rechts unten entspricht $500\ \mu\text{m}$). **B:** Mithilfe von *ImageJ* wurde die Anzahl der Partikel pro mm^2 auf den Arbeitselektroden bestimmt. Ohne BSA wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Elektroden mit Antikörpern und Kontrollelektroden bestimmt. Mit steigender BSA-Konzentration reduzierte sich die Partikelzahl pro mm^2 bei den Kontrollen. Die Anzahl der Partikel auf den Elektroden mit Antikörpern blieb jedoch für alle BSA-Konzentration bei ca. 500 pro mm^2 . Alle Balken sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen sind als *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ angegeben.

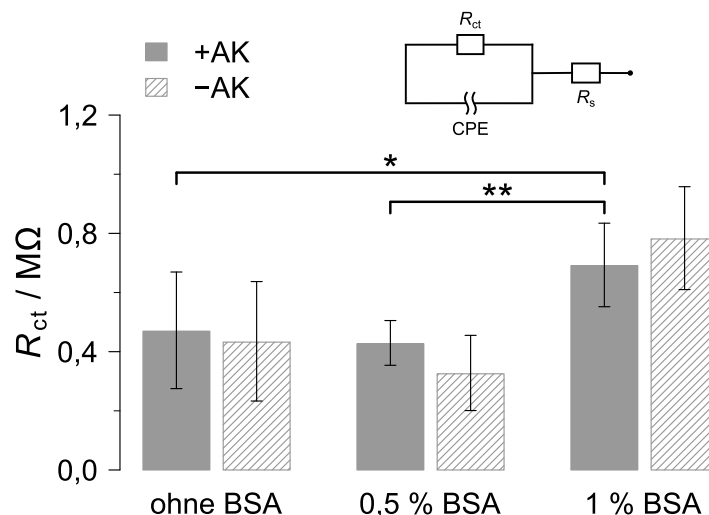


Abbildung 50: Impedanzmessungen zur Detektion von Polystyrolpartikeln auf dem 9WPtE-Biosensor. Zwischen den Elektroden mit Antikörpern (+ AK) und den Kontrollelektroden ohne Antikörper (–AK) waren für keine BSA-Konzentration signifikante Unterschiede im R_{ct} -Wert nach Partikelinkubation feststellbar. Allerdings zeigten die Elektroden mit 1 % BSA (w/v) einen doppelt so hohen R_{ct} als die Elektroden ohne und mit 0,5 % BSA (w/v). Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,1 M KCl. Alle Balken sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen sind mit * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ angegeben (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Der mikroskopisch beobachtete Anstieg der Spezifität der Partikeldetektion mit steigender BSA-Konzentration konnte impedimetrisch nicht nachgewiesen werden. Bei Nutzung von 1 % BSA betrug der Anteil partikelbedeckter Elektrodenfläche für Elektroden mit Antikörpern $0,14 \pm 0,02$ % und für Elektroden ohne Antikörper $0,03 \pm 0,02$ % (berechnet basierend auf Querschnittsfläche der Partikel von $2,7 \cdot 10^{-6} \text{ mm}^2$ und Fläche der Elektrode von $2,84 \text{ mm}^2$). Dieser Unterschied im Bedeckungsgrad der Elektroden durch unterschiedliche Partikelanzahl war nicht ausreichend, um einen Unterschied im Impedanzverhalten der Elektroden zu verursachen, ein Ergebnis das in Kapitel 5.6 weiter diskutiert wird. Der erhöhte R_{ct} -Wert für Elektroden, die mit 1 % BSA behandelt worden waren, lässt sich mit verstärkter unspezifischer Bindung von BSA an die Elektroden erklären.

4.8.2 Detektion von Polystyrolpartikeln mit dem Sensorobjektträger in einem Durchflusssystem

Da mit dem 9WPtE-Biosensor zwar mikroskopisch die spezifische Bindung von Polystyrolpartikeln nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht impedimetrisch, wurde noch ein anderer experimenteller Ansatz getestet. Dafür wurden statt dem 9WPtE-Elektrodenarraychip Objektträger mit gesputterten Elektroden genutzt.

Die Fertigung dieser Sensorobjektträger ist in Kapitel 3.3 beschrieben. Sie erfolgte mit Hilfe einer Maske (Abb. 51). In diese Sputtermaske wurden die Objektträger (drei gleichzeitig) eingelegt und durch sequenzielles HF-Magnetronsputtern von Indiumzinnoxid (ITO), Gold (Au) und Platin (Pt) streifenförmige Elektroden mit denselben Dicken wie bei den 9WPtE-Chips aufgebaut. Kontaktiert wurden die Elektroden durch Kabel, die mit Silberkleber befestigt wurden. Die Kabel besaßen Steckverbindungen, über die der Kontakt zum Potentiostaten hergestellt werden konnte. Auf jeden Sensorobjektträger wurde eine Durchflussskammer (*sticky-Slide I 0.2 Luer* von ibidi) aufgeklebt. Die Kammer hatte eine Höhe von 200 μm und ein Füllvolumen von 50 μl , bei einer Länge von 50 mm und einer Breite von 5 mm. Innerhalb der Kammer betrug das Verhältnis der Flächen von Arbeits- und Gegenelektrode 1:9, vergleichbar mit dem Verhältnis im 9WPtE-Chip (1:10). Die Referenzelektrode wurde mit Hilfe eines Adapters in eine der beiden Öffnungen der Kammer getaucht und stand somit über die Messlösung im Kontakt mit der Arbeitselektrode. Der Ag/AgCl-Draht war dafür in einem passenden Adapter befestigt. Kontakt zum Messgerät wurde über ein Klemmkabel hergestellt (Abb. 52).

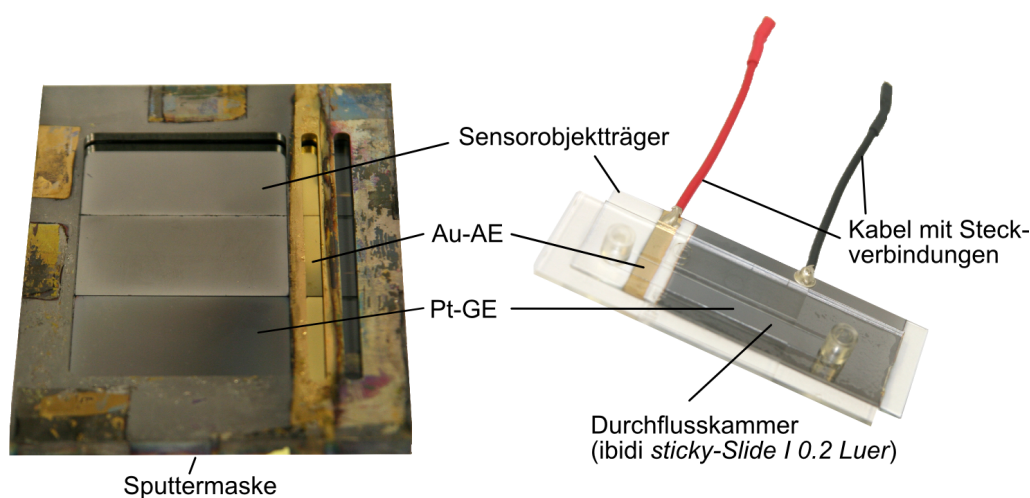


Abbildung 51: Sputtermaske und Sensorobjektträger. Mit einer für Standardobjektträger gefertigten Maske (links im Bild) wurden auf die Objektträger streifenförmige Goldarbeits- (Au-AE) und Platingegenelektroden (Pt-GE) gesputtert. An die Elektroden wurden Kabel mit Steckverbindungen durch Silberkleber befestigt und eine Durchflussskammer von ibidi (*sticky-Slide I 0.2 Luer*) aufgeklebt (rechts im Bild). Das Verhältnis der Flächen von Arbeits- und Gegenelektrode betrug innerhalb der Kammer 1:9.

Auf der Oberfläche der Arbeitselektroden der Sensorobjektträger wurde wie bei den Elektrodenarraychips eine biologische Erkennungsschicht aufgebaut, um die Polystyrolpartikel zu detektieren (siehe 3.8.2). Das Funktionsprinzip des Sensors ist in Abb. 53A dargestellt. Die Polystyrolpartikel wurden vor der Verwendung mit Kaninchen-anti-Ziege-Antikörpern inku-

biert. Diese banden an die Ziege-Antikörper, die auf der Partikeloberfläche vorhanden waren. Auf den Goldarbeitselektroden wurden währenddessen MUDA-SAMs aufgebaut, an die anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt wurden. Diese Antikörper erkannten spezifisch die Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper auf den Polystyrolpartikeln. Auf Kontrollelektroden wurden Antikörper immobilisiert, die keine Spezifität für die Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper aufwiesen. Die Partikelsuspension (0,17 mg/ml in PBS mit 1 % BSA w/v, ca. 51 Mio. Partikel pro ml) wurde in die Kammern pipettiert und 30 min auf den Sensorobjektträgern inkubiert. Danach folgte ein Waschvorgang, bei dem mit Hilfe einer Pumpe (Äkta) PBS als Waschpuffer für 10 min mit 0,1 ml/min durch die Durchflusskammern gespült wurde (Abb. 53B). Dabei wurde darauf geachtet, dass immer von der Arbeits- zur Gegenelektrode gespült wurde. Nach dem Waschen wurde die Sensoroberfläche fluoreszenzmikroskopisch und impedimetrisch untersucht.

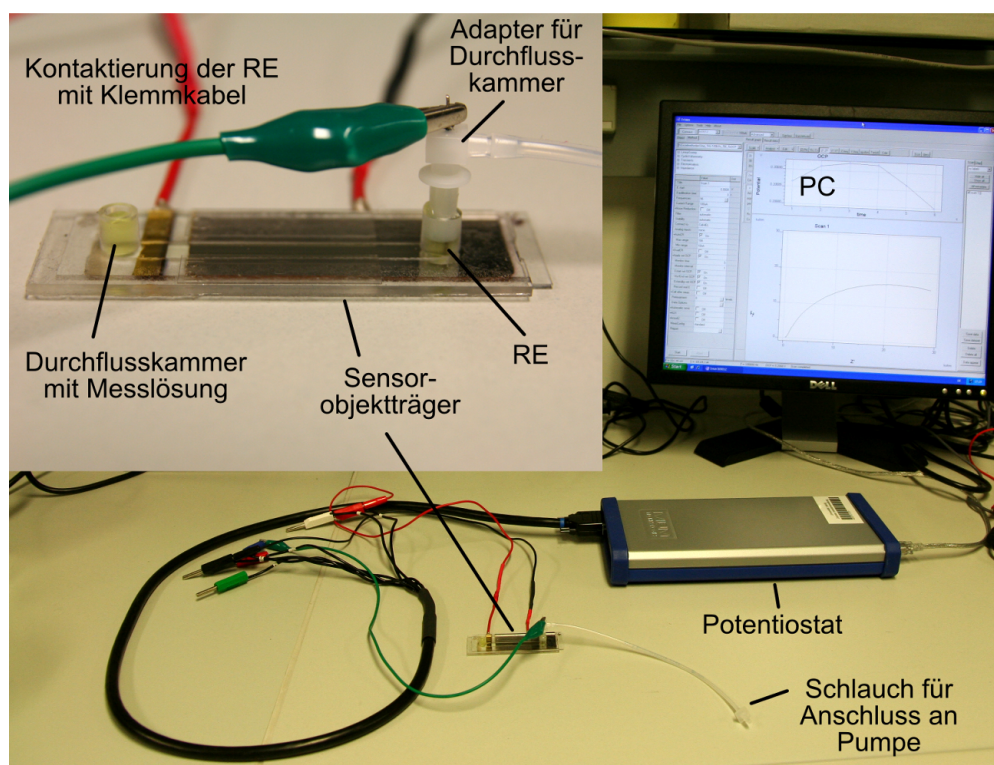


Abbildung 52: Aufbau der Messeinheit aus Sensorobjektträger, Referenzelektrode (RE), Potentiostat und Computer (PC). Die Elektroden des Sensorobjektträgers wurden über ihre Kabel mit Steckverbindungen an den Potentiostaten angeschlossen. Die Referenzelektrode (RE) wurde mit Hilfe eines Adapters in eine der beiden Öffnungen der Kammer getaucht und stand somit über die Messlösung im Kontakt mit der Arbeitselektrode (Bildausschnitt links oben). Der Adapter mit Schlauch diente dem Anschluss an eine Pumpe. Die RE wurde über ein Klemmkabel mit dem Messgerät verbunden. Der Potentiostat war seinerseits an einen Computer angeschlossen.

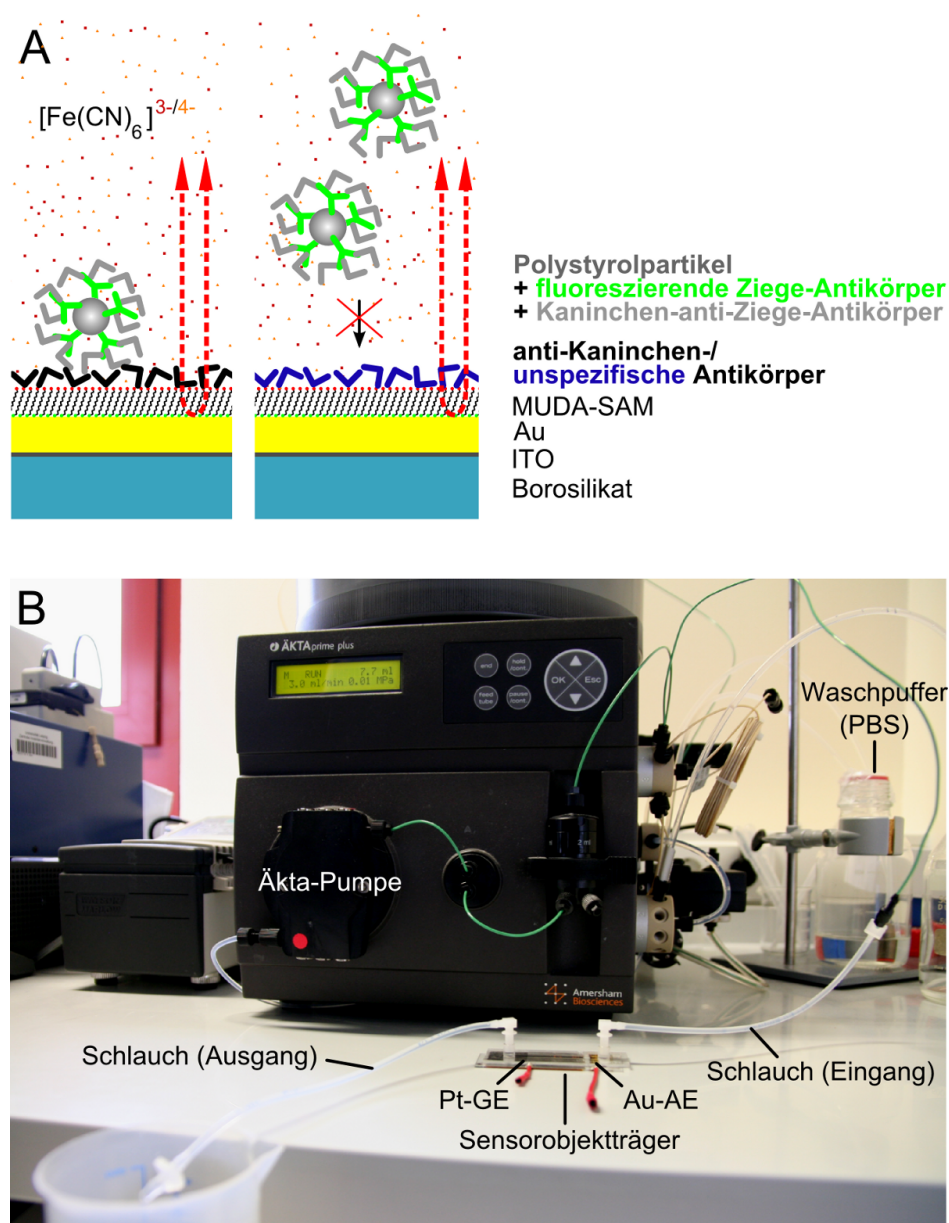


Abbildung 53: Prinzip der biosensorischen Detektion von Polystyrolpartikeln auf dem Sensorobjektträger und Aufbau des Durchflusssystems zum Waschen der Sensoroberfläche. A: Auf den Goldarbeitselektroden des Sensorobjektträgers wurden MUDA-SAMs aufgebracht. An diese SAMs wurden anti-Kaninchen-Antikörper (schwarz, links im Bild) kovalent gebunden. Auf den Kontrollelektroden wurden stattdessen unspezifische Antikörper (blau, rechts im Bild) immobilisiert. Die Polystyrolpartikel wurden vor ihrer Inkubation auf dem Biosensor mit Kaninchen-anti-Ziege-Antikörpern modifiziert. Diese banden an die auf der Partikeloberfläche vorhandenen Ziege-Antikörper. Der Nachweis der Bindung der Partikel erfolgte mikroskopisch über die Fluoreszenzmarkierung der Partikel und via Impedanzspektroskopie mit dem Redoxanalyten Ferri-/Ferrocyanid. **B:** Das Waschen der Elektroden des Sensorobjektträgers nach der Partikelinkubation erfolgte im Durchfluss mit PBS. Dafür wurde eine Äkta-Pumpe genutzt. Die Flussrichtung wurde so gewählt, dass immer von der Arbeits- zur Gegenelektrode gewaschen wurde.

4.8.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Auf den Oberflächen der Goldarbeits Elektroden mit den spezifischen anti-Kaninchen-Antikörpern wurden 1517 ± 541 Partikel gezählt und auf den Oberflächen der Kontrollelektroden mit den unspezifischen Antikörpern lediglich 416 ± 190 (Abb. 54). Dies entsprach einem Verhältnis von 3:1, was auf eine spezifische Bindung der Polystyrolpartikel schließen ließ.

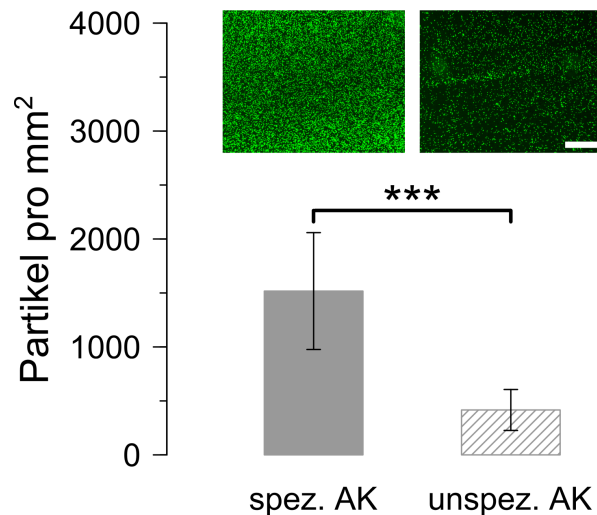


Abbildung 54: Fluoreszenzmikroskopische Detektion von Polystyrolpartikeln auf den Sensorobjektträgern. Auf den Arbeitselektroden der Sensorobjektträger mit spezifischen Antikörpern (spez. AK) wurden dreimal mehr Polystyrolpartikel nachgewiesen, als auf den Kontrollelektroden mit unspezifischen Antikörpern (unspez. AK). Der Maßstab im Bild der Kontrolle entspricht $500 \mu\text{m}$. Beide Balken sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz ist als *** $p < 0,001$ angegeben.

4.8.2.2 Impedanzspektroskopie

Impedanzspektren der Sensorobjektträger wurden nach Partikelinkubation zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit einem abgewandelten Randles-Ersatzschaltbild^[80] $((R_{\text{ct}} || \text{CPE}) - R_s)$ ausgewertet (Abb. 55). Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} diente als Kriterium zur Einschätzung des Bedeckungsgrads der Elektroden.

R_{ct} war für den Sensorobjektträger generell um zwei Größenordnungen niedriger, als bei den Versuchen mit dem 9WPtE-Elektrodenarraychip (Abb. 50 und Abb. 55 im Vergleich). Auch mit dem Durchflusssystem konnte trotz mikroskopisch bestätigter spezifischer Immobi-

lisierung der Partikel kein signifikanter Unterschied zwischen den Elektroden mit spezifischen Antikörpern und den Kontrollen beobachtet werden. Der Anteil partikelbedeckter Elektrodenfläche betrug für Elektroden mit spezifischen Antikörpern $0,95 \pm 0,25$ % und für Elektroden mit unspezifischen Antikörpern $0,26 \pm 0,09$ %, was im Vergleich zu den Experimenten mit dem 9WPtE-Chip nur einer Steigerung um eine Größenordnung entspricht. Aus diesem Grund wurde eine Reaktion zur Signalverstärkung getestet. Dafür wurden an die Polystyrolpartikel Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper gebunden. An diese Antikörper waren Peroxidasemoleküle gekoppelt. Peroxidase katalysiert die Redoxreaktion von 3-Amino-9-ethylcarbazol zum wasserunlöslichen Präzipitat 3-Azo-9-ethylcarbazol. Das Präzipitat verringert die Zugänglichkeit der Elektrode für das Redoxpaar Ferri-/Ferrocyanid. Die Präzipitattfällung wurde für 5, 10 und 20 min durchgeführt und nach jedem Schritt Impedanzspektren gemessen.

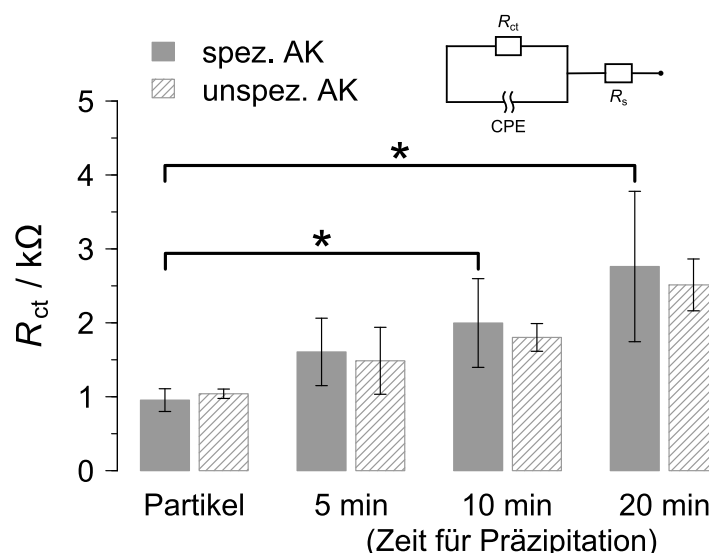


Abbildung 55: Impedanzmessungen zur Detektion von Polystyrolpartikeln auf den Sensorobjektträgern. Die aus den Impedanzmessungen in 5 mM Ferri-/Ferrocyanid und 0,5 M KCl bestimmten R_{ct} -Werte stiegen mit der Dauer der Präzipitation an. Zwischen den Elektroden mit spezifischen Antikörpern (spez. AK) und den Kontrollelektroden (unspez. AK) konnte kein signifikanter Unterschied im R_{ct} festgestellt werden. Alle Balken sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ angegeben (Ersatzschaltbild nach Randles^[80]).

Der Ladungstransferwiderstand zeigte eine Steigerung von ca. 1 kΩ nach Partikelbindung über 1,5 und 2 kΩ nach 5 bzw. 10 min Präzipitattfällung bis ca. 2,5 kΩ nach 20 min Präzipitattfällung (Abb. 55). Allerdings wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Elektroden mit spezifischen Antikörpern und den Kontrollen beobachtet. Eine spezifische Detektion der Polystyrolpartikel war mit dem Sensorobjektträger auch nur per Fluoreszenzmikroskopie nach-

weisbar. Die Änderung im Bedeckungsgrad der Elektroden durch Partikelbindung war nicht ausreichend, um Veränderungen im Impedanzverhalten der Elektroden zu verursachen.

4.8.3 Biosensorische Detektion von HEK293-Zellen über DCC-Rezeptoren

Mit Polystyrolpartikeln als Modell für Zellen wurde mikroskopisch eine spezifische Immobilisierung auf den Arbeitselektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips und der Sensorobjektträger nachgewiesen. Darauf aufbauend sollten vitale Zellen über immanente Zelloberflächenproteine detektiert werden. Das Prinzip dieses Zellsensors lehnte sich an das des Sensors für Polystyrolpartikel an (Abb. 56). Auf der Goldoberfläche der Arbeitselektroden wurde eine Thiolschicht aus 11-Mercaptoundekansäure aufgebaut und anschließend Antikörper kovalent gebunden. Diese Antikörper waren spezifisch für Zelloberflächenproteine der Zielzellen. Nach Inkubation des Biosensors mit Zellsuspensionen sollte das Binden der Zielzellen sowohl mikroskopisch als auch impedimetrisch nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten Zellen ohne das gewählte Oberflächenprotein.

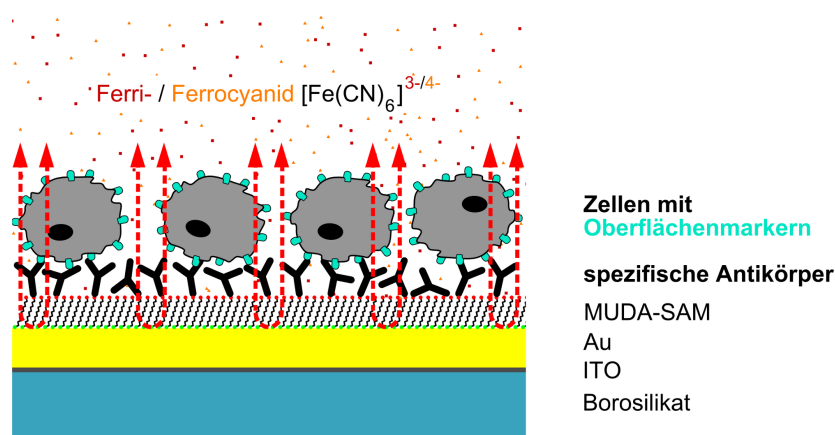


Abbildung 56: Schema der biosensorischen Detektion von ganzen Zellen. Schematisch dargestellt ist der Aufbau des Biosensors zur Detektion von ganzen Zellen. Die Goldarbeitselektrode wurde zuerst mit 11-Mercaptoundekansäure modifiziert. An diese Schicht wurden Antikörper kovalent gebunden, die Zelloberflächenproteine spezifisch erkennen konnten. Das Binden der Zielzellen aus einer Zellsuspension sollte mikroskopisch und impedimetrisch nachgewiesen werden.

4.8.3.1 HEK293-Zellen mit DCC-Rezeptor als Zellmodell

Als Zellmodell wurden HEK293-Zellen gewählt, Zellen einer menschlichen embryonalen Nierenzelllinie. Sie waren mit einem Vektor transfiziert, der die Expression des DCC-Proteins bewirkte. DCC, die Abkürzung für den englischen Begriff *Deleted in Colorectal Cancer*, steht für ein Gen, dessen Produkt einerseits als Rezeptor für Netrin eine Rolle bei der Leitung von

Axonen spielt und andererseits gilt DCC als Tumorsuppressorgen (siehe 1.7). An das Gen für den DCC-Rezeptor war auf dem Vektor noch die Sequenz für ein eCFP gekoppelt (siehe Anhang). Das eCFP (*enhanced Cyan Fluorescent Protein*) ist eine Modifikation des GFP (*Green Fluorescent Protein*) und dient als Fluoreszenzmarker. Es besitzt eine Anregungswellenlänge von 436 nm und eine Emissionswellenlänge von 470–550 nm. HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen, die DCC exprimierten, fluoreszierten in diesem Wellenbereich, da an das DCC das eCFP gekoppelt war (Abb. 57A). Die Fluoreszenzmikroskopie bot somit eine ständige Kontrolle der Expression von DCC während der Kultivierung.

Als Nachweis für die korrekte Expression des Fusionsproteins aus DCC und eCFP wurde ein *Western Blot* durchgeführt. Das Gesamtprotein der transfizierten HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf der Membran wurde das DCC-Protein immunologisch durch anti-DCC-Antikörper gebunden und die Position mittels Chemilumineszenzdetektion sichtbar gemacht (siehe 3.1.3.1). In Abb. 57B ist solch ein *Western Blot* dargestellt. Bei ca. 180 kDa wurde in der Spur des HEK293_{DCC-eCFP}-Zelllysats eine Bande detektiert. Die Bandenhöhe von 180 kDa entsprach dem Fusionsprotein von DCC (ca. 150 kDa) und eCFP (ca. 30 kDa). Als Kontrolle wurde das Zelllysate von untransfizierten HEK293-Zellen aufgetragen. Diese Spur wies keine Bande auf. Das ebenfalls immunologisch detektierte Haushaltsgen β -Aktin war in beiden Spuren vergleichbar stark gefärbt, was einen gleichmäßigen Probenauftrag bestätigte. Es wurden keine unspezifischen Banden detektiert. Demnach wurde das DCC-eCFP-Fusionsprotein in den transfizierten HEK293-Zellen exprimiert und in den HEK293-Wildtyp-Zellen nicht, weswegen diese als Kontrollzellen verwendet wurden.

DCC sollte als Rezeptor verstärkt an der Zellmembran lokalisiert sein, was es zum geeigneten Zelloberflächenmarker für die biosensorische Detektion macht. Mittels Immunzytochemie wurde die Lokalisierung von DCC untersucht. Dafür wurde derselbe Antikörper wie im *Western Blot* verwendet. Detektiert wurde die Fluoreszenzmarkierung eines Zweitantikörpers, der spezifisch an den anti-DCC-Antikörper band. HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen wiesen eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des Zellrands auf (Abb. 57C). Die Aufnahmen mit dem *Laser-Scanning*-Mikroskop erlaubten nicht nur eine Auflösung in zwei Dimensionen x und y, sondern ermöglichten durch schichtweise Aufnahme der Ebenen auch eine Auflösung in die dritte Dimension z. Die Aufnahmen der z-Dimension (*z-stack*) wiesen ebenso auf eine verstärkte Lokalisation von DCC im Zellmembranbereich hin (Abb. 57D). Die immunologischen Untersuchungen belegten somit die Expression von DCC in den HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen und Lokalisation im Bereich der Membran, was für den Einbau von DCC in die Membran spricht. DCC wurde daraufhin als Marker für die biosensorische Detektion der HEK293-Zellen genutzt.

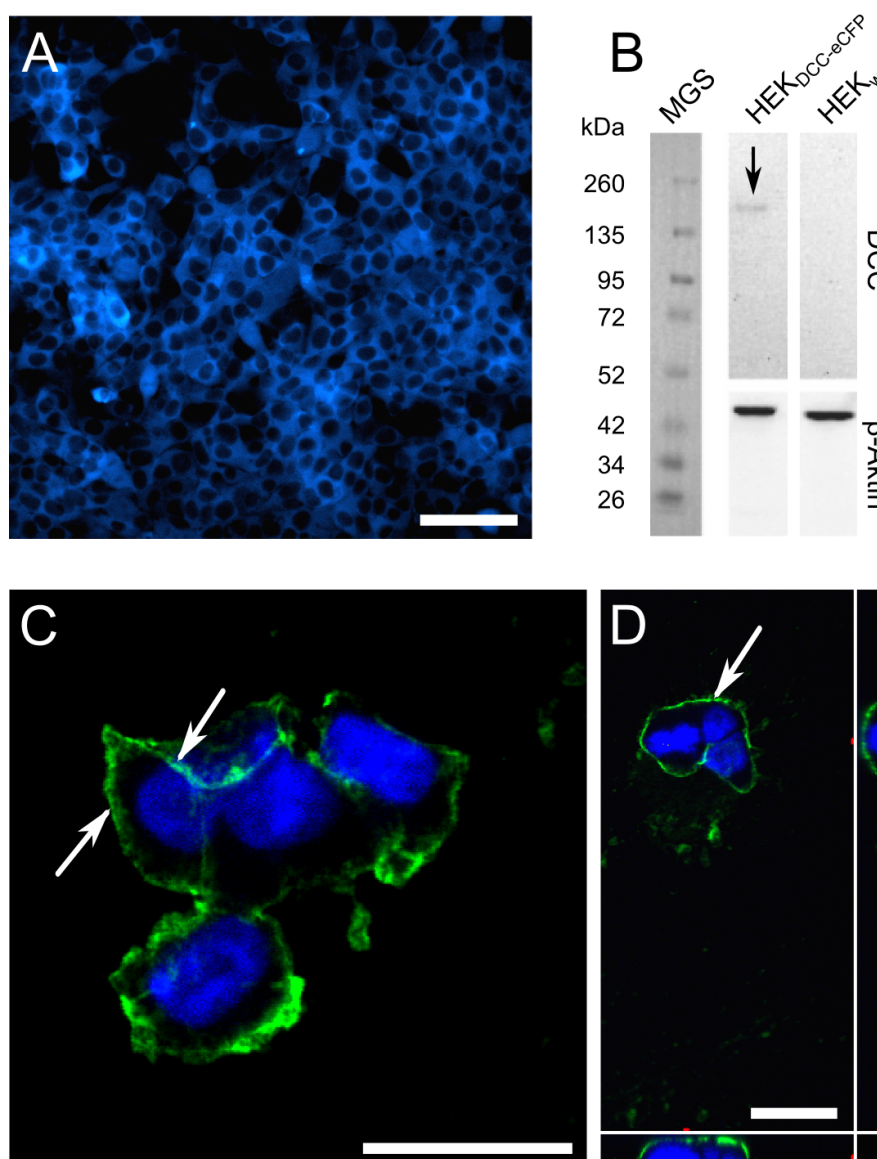


Abbildung 57: Nachweis der Expression und Lokalisation des DCC-eCFP-Fusionsproteins in HEK293-Zellen transfiziert mit einem Vektor mit DCC-eCFP-Gensequenz. **A:** HEK293-Zellen waren mit einem Vektor transfiziert, der das DCC-Gen fusioniert mit dem eCFP-Gen trug. Zellen, die das Fusionsprotein exprimierten, zeigten im Bereich von 470–550 nm eine Fluoreszenz, wenn bei 436 nm angeregt wurde. (Maßstab im Bild entspricht 100 μm). **B:** Mittels *Western Blot* wurde in den transfizierten Zellen (HEK_{DCC-eCFP}) DCC nachgewiesen. Die bei 180 kDa detektierte Bande entsprach dem Fusionsprotein von DCC und eCFP (Pfeil). Zum Vergleich ist links der Molekulargewichtsstandard (MGS) abgebildet. Im Zelllysate der Kontrollzellen (HEK_{wt}) wurde keine Bande detektiert. Das Haushaltsgen β -Aktin wurde in beiden Zelllysaten nachgewiesen (unten). **C:** Immunzytochemische Färbungen mit anti-DCC-Antikörpern zeigten eine Lokalisation von DCC im Randbereich der Zellen (grüne Fluoreszenz, Pfeile). Dies wird auch in der *z-stack*-Aufnahme (dritte Dimension) deutlich (**D**, rechts und unten). Die grüne DCC-Fluoreszenz befand sich nicht im Zytosol oder in Zellkernnähe (Kerne blau mit DAPI gefärbt), sondern im Bereich der Zellmembran. Die Maßstäbe in **C** und **D** entsprechen 50 μm .

4.8.3.2 Detektion von HEK293-DCC-Zellen mit Sensorobjektträgern in einem Durchflusssystem

Zum Aufbau von Biosensoren für HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen wurden erneut Sensorobjektträger mit streifenförmig gesputterten Elektroden eingesetzt (Abb. 51). Auf der Oberfläche der Goldarbeitselektroden wurden MUDA-SAMs immobilisiert und an diese SAMs die biologischen Erkennungselemente gekoppelt. Verwendet wurden die anti-DCC-Antikörper, die auch schon für den *Western Blot* und die Immunzytochemie verwendet worden waren. Die hergestellten Biosensoren wurden für 5 min mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen in einer Konzentration von 2 Mio. Zellen/ml inkubiert. Im Anschluss wurden die Elektroden mit einer Äkta-Pumpe für 10 min bei einer Flussrate von 3 ml/min gewaschen. Als Kontrollen wurden Sensorobjektträger mitgeführt, die mit HEK293-Wildtyp-Zellen (ohne DCC) inkubiert wurden. Die Elektroden wurden nach Zellinkubation und Waschen mikroskopisch und impedimetrisch untersucht.

Lichtmikroskopie Mikroskopisch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Arbeitselektroden, die mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen inkubiert worden waren und solchen, die mit HEK293-Wildtyp-Zellen inkubiert worden waren. Die Zellzahl pro mm² Elektrodenfläche betrug für beide ca. 900 (Abb. 58A). Die Zellen zeigten folglich unspezifische Adhärenz an die Elektrodenoberfläche.

Impedanzspektroskopie Impedanzspektren der Sensorobjektträger wurden nach Zellinkubation zwischen 1 Hz und 100 kHz (11 Frequenzen pro Dekade) in 5 mM Ferri-/Ferrocyanoide und 0,5 M KCl bei einer Wechselspannungsamplitude von 10 mV gegen das offene Zellpotential aufgezeichnet. Die Messdaten wurden mit einem abgewandelten Randles-Ersatzschaltbild^[80] $((R_{ct} || CPE) - R_s)$ ausgewertet (Abb. 58B). Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} diente als Parameter zur Einschätzung des Bedeckungsgrads der Elektroden.

Zwischen Elektroden inkubiert mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen und Elektroden inkubiert mit HEK293-Wildtyp-Zellen wurde kein signifikanter Unterschied im R_{ct} -Wert gemessen (Abb. 58B). Für Elektroden mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen betrug er $9,0 \pm 3,1$ k Ω und für die Kontrollelektroden $6,2 \pm 5,4$ k Ω .

Vitalitätsüberprüfung Die Zellen wurden auf den Elektroden nach der Impedanzmessung mit Calcein-AM (Calcein-Acetoxy-methylester) versetzt. Diese Substanz kann Zellmembranen vitaler Zellen durchdringen. Im Zytosol lebender Zellen wird durch Esterasen der Acetoxy-methylrest abgespalten. Das freiwerdende Calcein fluoresziert (Anregungsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 515 nm), wodurch die Vitalität der Zellen überprüft werden kann. In Abb. 58A sind beispielhaft Ausschnitte der Arbeitselektroden mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen und HEK293-Wildtyp-Zellen ohne DCC zu sehen. Sie wurden für 5 min mit Calcein-AM ver-

setzt. Das Zytosol nahezu aller lichtmikroskopisch detektierten Zellen fluoreszierte, was auf eine hohe Vitalität hinwies.

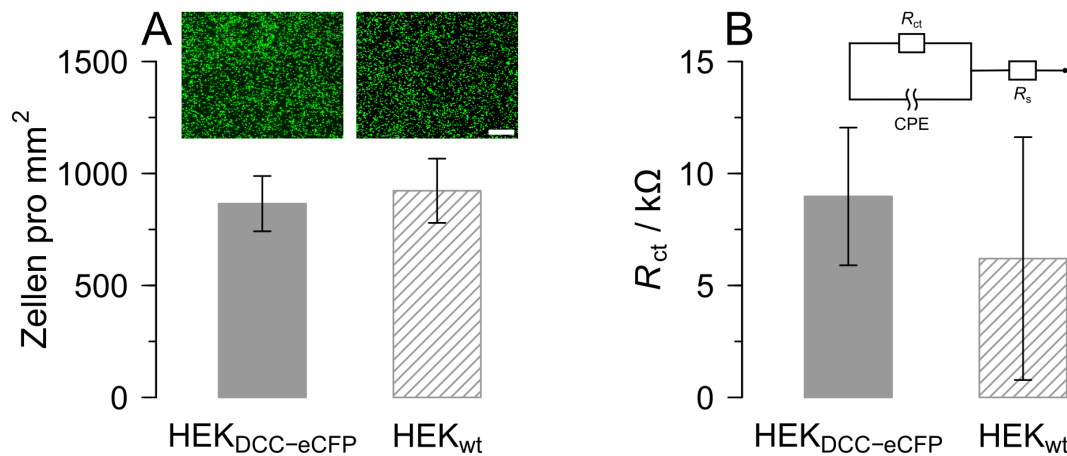


Abbildung 58: Mikroskopische und impedimetrische Detektion von HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen auf den Sensorobjektträgern. **A:** Die mikroskopischen Aufnahmen der Arbeitselektroden mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen zeigten kaum Unterschiede zu den Kontrollelektroden mit HEK293-Wildtyp-Zellen (HEK_{wt}). Für beide Ansätze wurden ca. 900 Zellen pro mm² Arbeitselektrodenfläche gezählt. Sowohl die HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen als auch die HEK293-Zellen ohne DCC zeigten nach Calcein-AM Färbung eine starke Fluoreszenz, die auf hohe Vitalität hindeutete. Der Maßstab im Kontrollbild entspricht 500 μm . **B:** Auch impedanzspektroskopisch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Elektroden inkubiert mit HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen und den Kontrollelektroden mit Wildtypzellen gemessen. Die Balken für **A** und **B** sind Mittelwerte \pm die Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Als Messlösung diente 5 mM Ferri-/Ferrocyanid in 0,5 M KCl.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Spezifität, die bei der Immobilisierung der Polystyrolpartikel erreicht werden konnte, bei der Detektion von HEK293_{DCC-eCFP}-Zellen nicht erreicht wurde. Der Grund für die geringe Spezifität des Zellbiosensors war die unspezifische Adhärenz der Zellen an die Elektroden. Jedoch konnte auch 30 min nach der Zellinkubation eine hohe Vitalität der Zellen auf den Elektroden nachgewiesen werden.

5 Diskussion

„Experience is what you get when you didn't get what you wanted.“

(Randy Pausch 1960-2008)

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von elektrochemischen Biosensoren für die medizinische Diagnostik, speziell für die Tumordiagnostik. Als Basis dazu dienten Elektrodenarraychips mit integriertem Ag/AgCl-Referenzsystem.

Im folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung des Referenzsystems und der 9WPtE-Elektrodenarraychips diskutiert, außerdem werden die Ergebnisse der Funktionalisierung der Arbeitselektroden, der biosensorischen Detektion des Tumormarkers Tenascin C (TnC) und der Detektion von HEK293-Zellen über den Membranrezeptor DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) analysiert.

5.1 Stabilität und Regulierung des offenen Ag/AgCl-Referenzsystems

Für die elektrochemischen Messungen mit den 9WPtE-Elektrodenarraychips war die Integration von Referenzelektroden nötig. So konnten die Messungen in einer Dreielektrodenkonfiguration durchgeführt werden, bei der das Potential zwischen der Arbeitselektrode und der Referenzelektrode gemessen und geregelt wird und der Strom zwischen der Arbeitselektrode und der Gegenelektrode fließt. Erst die Kontrolle des Arbeitselektrodenpotentials ermöglichte die Untersuchung von Redoxreaktionen an dieser Elektrode durch Zyklovoltammetrie und Impedanzspektroskopie. Der Umsatz von Redoxsubstanzen gibt Aufschluss über die Beschaffenheit des Messsystems. Verändert sich dieses, z. B. beim Aufbau von Biosensoren oder bei der Detektion von Analyten, dann können die Veränderungen elektrochemisch verfolgt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Referenzsystem verwendet, bei dem für jedes Paar aus Arbeits- und Gegenelektrode eine eigenständige Referenzelektrode integriert wurde. Die Referenzelektroden bestanden aus einem Silberdraht beschichtet mit Silberchlorid. Ag/AgCl-Elektroden werden oft als Referenzen verwendet^[10–12,36–38,114–116]. Sie sind einfach herstellbar, z. B. wie in dieser Arbeit durch Galvanisierung, ihr Potential ist sehr gut reproduzierbar und

im Gegensatz zu Referenzelektroden basierend auf Quecksilber (z. B. Kalomelektrode) sind ihre Bestandteile nicht giftig^[77]. Außerdem können Ag/AgCl-Elektroden für den Einsatz in Biosensoren einfacher miniaturisiert werden. So wurden in dieser Arbeit Ag/AgCl-Drähte mit ca. 0,7 cm Länge und einem Durchmesser von 0,5 mm verwendet. Sie wurden in einen, zum 9WPtE-Chip passenden, Deckel integriert.

Die Elektroden waren von der Messlösung nicht abgeschirmt, d. h. es wurde mit einem offenen Referenzsystem gemessen. Dadurch konnte die Größe der Referenzen gering gehalten werden, um eine Integration in den 9WPtE-Elektrodenarraychip zu ermöglichen. Trotz dem Vorteil der Miniaturisierbarkeit finden sich in der Literatur vergleichsweise wenige Beispiele für offene Ag/AgCl-Referenzsysteme^[37,132,133]. Dies beruht vermutlich auf den Nachteilen der offenen Systeme, die da wären: Elektrolytabhängigkeit des Referenzpotentials, Abbau der AgCl-Schicht und Verunreinigung der Referenzelektroden. In dieser Arbeit wurden die Nachteile durch bestimmte Vorkehrungen unterbunden, um die Elektroden so klein wie möglich zu fertigen und trotzdem ein stabiles Referenzpotential zu gewährleisten. Die offenen Ag/AgCl-Elektroden waren nicht von der Messlösung abgeschirmt und auch nicht von einer eigenen AgCl-gesättigten Elektrolytlösung mit entsprechender Chloridionenkonzentration umgeben. Dadurch hing das Referenzpotential von der Chloridionenkonzentration im Messelektrolyten ab, was aber durch Zugabe von KCl als Leitsalz kontrolliert werden konnte. Ein Auflösen der AgCl-Schicht auf der Elektrode wurde nicht beobachtet. Die Messlösungen waren zwar nicht mit AgCl gesättigt, doch wurden Schäden in der AgCl-Schicht jederzeit durch die chloridionenhaltige Messlösung regeneriert. Eventuell gelöste Silberionen konnten die elektrochemischen Messungen nicht beeinflussen, da das Standardpotential von Silberionen (+800 mV *vs.* Standardwasserstoff, entspricht ca. +512 mV *vs.* Ag/AgCl bei einer KCl-Konzentration von 0,1 M) außerhalb des Messbereichs lag. Verunreinigungen der Ag/AgCl-Elektroden durch fehlende Abschirmung wurden auch nicht beobachtet. Der Deckel mit den Referenzelektroden wurde nur während der Messungen aufgesetzt, weswegen die Elektroden allein mit dem Messelektrolyten in Kontakt kamen. Nach jeder Messung wurden die Elektroden mit Reinstwasser abgespült und trocken gelagert. Darüber hinaus konnten die Ag/AgCl-Drähte bei Fehlfunktion problemlos ausgetauscht werden.

Das Potential der offenen Ag/AgCl-Elektroden (Halbzellpotential) wurde nach der Nernst-schen Gleichung (Formel 17) von der Chloridionenkonzentration im umgebenden Elektrolyten bestimmt. Um eine konstante Chloridionenkonzentration und somit ein konstantes Referenzpotential zu erreichen, wurde als Leitsalz KCl verwendet, dessen Konzentration sich während der Messung nicht änderte. Dem Elektrolyt wurde für die elektrochemischen Messungen Ferri-/Ferrocyanid (Kaliumhexacyanoferrat III/II) als Redoxsubstanz zugesetzt. Die Stabilität des Potentials der elektrochemischen Zelle (E'^0), bestehend aus den Halbzellen Ag/AgCl und Ferri-/Ferrocyanid, wurde durch die zykelvoltam-

metrischen Messungen bestätigt. Bei allen Messungen mit konstanter KCl-Konzentration wurde ein konstantes Zellpotential gemessen. Dessen Standardabweichung beschränkte sich sowohl zwischen unabhängigen Experimenten als auch zwischen unabhängigen Referenzelektroden auf lediglich 5-15 mV (ca. 5 %). Damit war die Standardabweichung der selbstgebauten, offenen Referenzen vergleichbar mit der von kommerziellen, geschlossenen Ag/AgCl-Referenzsystemen wie z. B. der LD-Serie von Castle Electrodes, der Ag/AgCl-Referenzelektrode von Cormet Testing Systems oder den Ag/AgCl-Elektroden von BASi (Angaben der Hersteller in Produktbroschüren, <http://www.castle-electrodes.com/downloads/Silver-chloride-electrodes-LD10-datasheet.pdf>, http://www.cormet.fi/pdf/PDF_Ag-AgCl_reference_electrode.pdf, <http://www.basinc.com/mans/silver.pdf>, URLs aufgerufen am 20.04.2012).

Um das Zellpotential für eine beliebige KCl-Konzentration im Elektrolyten voraussagen zu können, wurde eine theoretische Berechnungsgrundlage aufgestellt. Zur Bestimmung der Halbzellpotentiale nach der Nernstschen Gleichung (z. B. für Ag/AgCl mit Formel 17) wurden die Aktivitätskoeffizienten von KCl und Ferri-/Ferrocyanid benötigt. Sie wurden mit der halb-empirische Davies-Gleichung, die sich an die Debye-Hückel-Theorie (Formel 23) anlehnt, berechnet. In der Davies-Gleichung wird ein zusätzlicher empirischer Messparameter C eingeführt (Formel 25). Die Gleichung gilt dann für Ionenstärken $\leq 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Unter Verwendung von Literaturwerten der Aktivitätskoeffizienten für KCl^[122,123] und Ferri-/Ferrocyanid^[122,123] wurden die Parameter B \AA und C auch für Ionenstärken über $10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ angepasst (siehe Abb. 22). Mit den Aktivitätskoeffizienten aus der angepassten Davies-Gleichung und den Literaturwerten der Standardpotentiale für Ag/AgCl (222 mV^[128]) und Ferri-/Ferrocyanid (361 mV^[131]) ließen sich die Zellpotentiale für beliebige KCl-Konzentrationen berechnen. Beim Vergleich der gemessenen mit den berechneten Werten für E'° wurde eine Differenz von maximal 40 mV beobachtet. Der berechnete Kurvenverlauf gab die Messwerte trotz der Differenz sehr gut wieder (Abb.23). Da die Standardpotentiale aus der Literatur einen großen Einfluss auf das berechnete Zellpotential hatten, können Fehler in diesen Werten die Differenz erklären. Die Berechnung nach Davies erlaubt eine Einschätzung der zu erwartenden Zellpotentiale für beliebige KCl-Konzentrationen, somit kann der Messbereich für die zykovoltammetrischen Messungen eingegrenzt werden oder es können defekte Referenzelektroden identifiziert werden.

5.2 Festlegung der Leitsalz- und Redoxionenkonzentration

Die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid verläuft an Goldelektroden typischerweise quasi-reversibel. Dieses Verhalten wurde auch in der vorliegenden Arbeit zykovoltammetrisch nachgewiesen. Anhand der Form der Zykovoltammogramme lassen sich bestimmte Kriterien ab-

lesen, die eine Aussage zum Reaktionsmechanismus ermöglichen. Diese Kriterien sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die CV-Messungen mit den 9WPtE-Elektrodenarraychips in einer Messlösung mit KCl und Ferri-/Ferrocyanid zeigten gleich große Stromstärkepeaks für Oxidation und Reduktion der Redoxspezies. Außerdem nahm die Höhe der Peaks mit der Wurzel der Potentialvorschubgeschwindigkeit (Scanrate) linear zu. Beides sind Anzeichen für eine reversible Reaktion. Allerdings nahm die Peakseparation auch mit der Scanrate zu. Sie stieg um ca. 4 mV bei Erhöhung der Scanrate um 50 mV/s. Dies war ein Anzeichen für einen quasi-reversiblen Reaktionsmechanismus, bei dem der Ladungsaustausch teilweise gehemmt war. Ebenfalls ein Anzeichen für eine durchtrittskontrollierte, quasi-reversible Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid war die im Vergleich zum theoretischen Wert von 59 mV erhöhte Peakseparation. Selbst bei einer kleinen Scanrate und hoher Leitsalzkonzentration und somit geringem ohmschen Spannungsabfall wich die gemessene Peakseparation mit ca. 75 mV vom theoretischen Wert ab.

Von einem quasi-reversiblen Reaktionsmechanismus konnte, basierend auf den zykl voltammetrischen Messungen, nur ausgegangen werden, wenn das Leitsalz KCl in einer Konzentration von 0,08 M und höher eingesetzt wurde. Bei niedrigeren Konzentrationen sank die Peakstromstärke soweit ab, dass keine definierten Peaks detektiert wurden. Außerdem nahm die Peakseparation mit sinkender KCl-Konzentration drastisch zu, von 0,08 auf 0,04 M um 100 mV. Eine ausreichende KCl-Konzentration (c_{KCl}) war einerseits für die Stabilität des Referenzsystems und des gemessenen Zellpotentials wichtig, da das Potential der offenen Ag/AgCl-Elektrode von der Chloridionenkonzentration in der Messlösung abhing. Andererseits war eine ausreichende Leitsalzkonzentration nötig, um den Stromfluss zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode zu gewährleisten. Als ein weiterer Aspekt muss die Verringerung der elektrostatischen Abschirmung der Redoxionen bei hohen Leitsalzkonzentrationen betrachtet werden. Dadurch wird der Ladungsdurchtritt begünstigen.

Auch impedimetrisch konnte der Einfluss der KCl-Konzentration beobachtet werden. Die Rohdaten der Impedanzmessungen wurden mit Hilfe eines abgewandelten Randles-Ersatzschaltbildes^[80] bestehend aus Ladungstransferwiderstand R_{ct} , Warburgimpedanz Z_{W} , konstantem Phasenelement (CPE) und Lösungsmittelwiderstand R_{s} ($((R_{\text{ct}} - Z_{\text{W}}) || \text{CPE}) - R_{\text{s}}$) ausgewertet. Dazu wurde eine Anpassungsroutine nach der Nelder-Mead-Methode (siehe 3.5.5.1) verwendet. Aus der Anpassung der Rohdaten wurden die einzelnen Impedanzparameter berechnet. Fehlinterpretationen der Daten durch die Anpassung konnten ausgeschlossen werden. Alle beobachteten signifikanten Änderungen der Impedanzparameter waren demnach durch Änderungen im Messsystem (z. B. Erhöhung von c_{KCl}) verursacht. Der Lösungsmittelwiderstand nahm erwartungsgemäß mit steigender KCl-Konzentration ab, da mehr Ladungsträger vorhanden waren. Auch der R_{ct} nahm bei Erhöhung von c_{KCl} ab, weil die Hydratisierung der Redoxionen und die Dicke des Dielektrikums abnahmen, womit der Umsatz von Ferri-/

Ferrocyanid an der Elektrode stieg. Mit der Abnahme der Dicke des Dielektrikums durch steigende c_{KCl} ließ sich auch die Zunahme des CPE-Parameters A erklären, der sich wie eine Kapazität verhielt. Da für die biosensorische Anwendung der Elektroden der 9WPtE-Chips eine niedrige Ausgangsimpedanz, folglich vor allem ein niedriger Wert für R_{ct} nötig war, wurde für alle folgenden Messungen eine Leitsalzkonzentration von mindestens 0,1 M eingesetzt. In anderen Arbeiten zu impedimetrischen oder zykovoltammetrischen Biosensoren wurden ebenfalls Leitsalzkonzentrationen von mindestens 0,1 M verwendet, wobei neben KCl^[9,114,116,134] oft PBS^[37,42,68,69] zum Einsatz kam, wenn mit geschlossenen Referenzen gearbeitet wurde.

Ferri- und Ferrocyanid wurden in allen Messungen äquimolar eingesetzt. Damit konnte das gemessene Zellpotential mit dem formalen Standardpotential gleichgesetzt werden (siehe Formel 2). In den zykovoltammeterischen Messungen bestimmte die Ferri-/Ferrocyanidkonzentration (c_{FeCy}) die Höhe der Stromstärkepeaks. Die Peakhöhe nahm, wie in der Randles-Sevcik-Gleichung für reversible Redoxreaktionen beschrieben, linear mit steigender Konzentration der Redoxionen zu. Da die Redoxionen maximal mit 5 mM eingesetzt wurden, war das Referenzpotential und somit das gemessene Zellpotential nicht beeinträchtigt. Die Ionenstärke wurde von der mindestens zwanzigfach höheren Konzentration des Leitsalzes bestimmt. Die Peakseparation nahm allerdings mit steigender Ferri-/Ferrocyanidkonzentration zu, was wiederum einen quasi-reversiblen Reaktionsmechanismus bestätigte (siehe 4.4.3.1). Für weitere biosensorische Verwendung der 9WPtE-Chips war eine möglichst hohe CV-Signalstärke bzw. hohe Stromstärkepeaks der sauberen Elektroden nötig, um Änderungen, z. B. durch die Immobilisierung von Molekülen, verfolgen zu können. Daher wurden Ferri- und Ferrocyanid in allen folgenden CV-Messungen in einer Gesamtkonzentration von 1 mM und höher eingesetzt. Auch impedimetrisch wurde diese untere Konzentrationsgrenze bestätigt. Bei kleineren Konzentrationen lagen der Ladungstransferwiderstand und die Warburgimpedanz der sauberen Elektroden zu hoch, um Änderungen, z. B. durch den Aufbau von Biosensoren, beobachten zu können. In der Literatur finden sich ebenfalls meist Werte für c_{FeCy} zwischen 1 und 5 mM, sowohl für CV-, als auch für Impedanzmessungen^[9,15,68,70,114,116].

Die Leitsalz- und die Redoxionenkonzentrationen im Elektrolyten hatten folglich einen großen Einfluss auf die Signalstärke der CV- und Impedanzmessungen mit den 9WPtE-Chips und den offenen Ag/AgCl-Referenzen. Im Falle von massiven Änderungen der Zugänglichkeit der Elektroden, z. B. durch Verunreinigungen oder durch die Immobilisierung isolierender Schichten, könnte demnach die resultierende Verringerung der Signalqualität mit einer Erhöhung der Konzentration von KCl oder Ferri-/Ferrocyanid kompensiert werden.

5.3 Signalqualität der 9WPtE-Elektrodenarraychips

5.3.1 Design des 9WPtE-Elektrodenarrays

Als Basis zum Aufbau von neuartigen Biosensoren für die Tumordiagnostik wurden in dieser Arbeit Elektrodenarraychips entworfen und gefertigt. Diese bestanden aus 3×3 Elektrodenpaaren (siehe Abb. 15A) im 96-*well*-Maßstab (ANSI-Standard, *American National Standards Institute*). Die kreisförmigen Goldarbeitselektroden wurden dabei von den Platingegelektroden in Form von offenen Kreisringen umschlossen. Die Gegenelektroden schlossen genau mit den auf den Chip aufgeklebten 3×3 *wells* aus 96-*well*-Platten (ANSI) ab. Damit füllte jedes Elektrodenpaar das *well* bzw. den Reaktionsraum optimal aus. Das Design des Elektrodenarrays würde auch eine weitere Miniaturisierung erlauben, z. B. eine Übertragung in den 384-*well*-Maßstab. Von den Elektrodenpaaren gingen Goldleiterbahnen aus, die in Goldkontaktpads am Rand des Arrays mündeten. Jeder Chip hatte Ausmaße von $49 \times 49 \times 1 \text{ mm}^3$ (alle Maße in Abb. 9). Arbeits- und Gegenelektrode waren so entworfen, dass das Verhältnis ihrer Flächen ca. 1:10 betrug. Durch die wesentlich größere Gegenelektrodenfläche konnte der Beitrag dieser Elektrode zur Gesamtimpedanz vernachlässigt werden. Nur die Vorgänge an der Arbeitselektrode bestimmten die gemessene Impedanz. Diese Strategie zur Verringerung des Einflusses der Gegenelektrode auf die Impedanz des Messsystems wurde auch schon von Lisdat und Schäfer beschrieben^[81].

5.3.2 Präparation dünner Metallschichten auf Borosilikat

Für die Präparation von dünnen Metallschichten im Nanometerbereich, wie sie im 9WPtE-Chip angestrebt wurden, stehen verschiedene Techniken zur Verfügung: die Elektrodeposition (Galvanisierung), die stromlose chemische Deposition (Redoxreaktion in Lösung), die chemische Gasphasenabscheidung (Metall wird durch chemische Reaktion aus Gasphase abgeschieden) und die physikalische Gasphasenabscheidung (Metall wird durch physikalischen Vorgang aus Gasphase abgeschieden). Zur physikalischen Gasphasenabscheidung zählt die Kathodenzerstäubung, auch Sputtern genannt. Diese Technik wurde für das Aufbringen der Strukturen des 9WPtE-Elektrodenarraychips ausgewählt. Dabei wird in eine Vakuumkammer ein Edelgas eingeführt. In einem elektrischen Feld wird das Gas durch Stoßionisation in einen Plasmazustand mit getrennten Edelgasionen und Elektronen überführt. Die Edelgasionen werden beschleunigt und schlagen Atome aus dem aufzubringenden Material, *Target* genannt (z. B. Gold), welche sich dann in einer dünnen Schicht auf dem Substrat abscheiden. Das Sputtern kann sowohl im Gleichstromfeld als auch in einem Wechselstromfeld erfolgen. Zusätzlich kann bei beiden Betriebsarten ein Dauermagnetfeld angelegt werden. Es überlagert das elektrische Feld, treibt die Elektronen auf eine Kreisbahn nahe des *Targets* und erhöht somit die Effizienz der Stoßionisation und letztlich die Abscheiderate.

Wie sich die durch HF- und DC-Magnetronspattern gebildeten Schichten unterscheiden, wurde bisher nur in wenigen Arbeiten vergleichend analysiert. Diese Arbeiten weisen allerdings darauf hin, dass mit der HF-Technik glattere Oberflächen erreicht werden können. Eine auf Rasterkraftmikroskopie (AFM) basierte Untersuchung von Cr-Oberflächen durch Park und Lee *et al.* ergab nach HF-Magnetronspattern eine glattere Oberfläche als nach DC-Magnetronspattern^[135]. Schuler und Alkasi *et al.* verglichen rasterkraftmikroskopisch die Oberflächenrauigkeit von Zinkoxidfilmen, die sie ebenfalls mittels DC- und HF-Magnetronspattern hergestellt hatten. Dabei stellten sie für die mit HF gesputterten Filme eine ca. zehnmal niedrigere Rauigkeit fest als für die mit DC gesputterten Filme^[136]. Für Edelmetalle wie Gold wurden in der Literatur keine entsprechenden vergleichenden Experimente beschrieben. Um dies in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, wurden die Metallschichten der 9WPtE-Elektrodenarraychips sowohl unter Verwendung von HF- als auch DC-Magnetronspattern hergestellt. Anschließend wurden die Arbeitselektroden hinsichtlich ihrer Oberflächenrauigkeit mittels AFM untersucht. Die mit DC gesputterten Oberflächen zeigten eine mittlere Rauigkeit r_a von $3,8 \pm 0,6$ nm, wohingegen die mit HF gesputterten Oberflächen der Arbeitselektroden lediglich eine Rauigkeit von $1,9 \pm 0,4$ nm besaßen. Elektrochemisch wurden allerdings kaum Unterschiede zwischen den mit HF und DC gesputterten Elektroden gemessen. Nur der impedimetrisch bestimmte CPE-Parameter A , der mit einer Kapazität vergleichbar ist, lag für die durch DC-Sputtern gefertigten Elektroden um ca. $0,3 \mu\text{Fs}^{n-1}$ höher als für die mit HF gesputterten Elektroden. Dieser Unterschied lag jedoch im Bereich der Standardabweichung. Möglicherweise lässt er sich mit der erhöhten effektiven Oberfläche der rauerer mit DC gesputterten Elektroden erklären. Eine größere Oberfläche erhöht auch die Kapazität bzw. A (siehe Formel 16).

Auch wenn elektrochemisch kein Unterschied festgestellt wurde, war der Unterschied in der Oberflächenrauigkeit zwischen den beiden Sputtertechniken entscheidungsrelevant. Die Funktionalisierung der Elektrodenoberflächen und der Aufbau von Biosensoren erforderten möglichst glatte Oberflächen. Unebenheiten hätten die Stabilität der biologischen Erkennungsschichten verringert^[137]. Aus diesem Grund wurde für die weitere Herstellung der Chips das Sputterverfahren verwendet, bei dem die geringere Oberflächenrauigkeit erreicht wurde, das HF-Magnetronspattern.

Als Material für die Leiterbahnen, Kontaktpads und Elektroden wurde Gold gewählt. Gold hat verglichen mit anderen Elektrodenmaterialien einige Vorteile. Es ist, beispielsweise verglichen mit Silber, Kupfer oder Palladium, inert gegen die meisten Chemikalien. Dadurch können auch aggressive Reinigungsmittel wie Piranha-Lösung (konzentrierte Schwefelsäure mit Wasserstoffperoxid, meist im Verhältnis 2:1) verwendet werden. Gold korrodiert auch nicht an der Oberfläche und bildet keine Patina so wie z. B. Silber oder Kupfer^[138]. Es oxidiert nicht bei Temperaturen unter seinem Schmelzpunkt (1064°C) und reagiert nicht mit atmosphärischem

Sauerstoff. Ein weiterer Vorteil von Gold als Elektrodenmaterial ist seine einfache Funktionalisierbarkeit. Um Moleküle, wie beispielsweise Antikörper, als biologische Messfühler stabil auf die Goldoberfläche aufzubringen kann die Chemoligation mittels Thiolen genutzt werden. Thiole zeigen eine starke Affinität zu Gold, stärker als für andere Metalle wie Silber oder Platin. Außerdem ist die Stabilität der sich selbst-organisierenden Thiofschichten auf Gold höher als auf Palladium, Platin oder Silber, vor allem wenn die Thiofschicht in Kontakt mit atmosphärischem Sauerstoff steht. Zusätzlich zu den chemischen und physikalischen Vorteilen besitzt Gold auch einen biologischen. Es ist nicht toxisch und somit kompatibel mit Zellen, was z. B. für die biosensorische Detektion lebender Zellen wichtig ist.^[139]

Für die weitere biosensorische Anwendung der 9WPtE-Chips wurden die Goldarbeitselektroden funktionalisiert, d. h. auf ihnen wurden Antikörper oder Antigene immobilisiert (siehe 5.4). Dafür wurden Thiole genutzt, die mit hoher Affinität an Gold binden und auf Goldoberflächen selbst-organisierende Monoschichten (SAMs) bilden. An diese Schichten wurden die biologischen Erkennungsmoleküle durch Chemoligation mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) kovalent gebunden. Um nur die Goldoberflächen der Arbeitselektroden und nicht die der Gegenelektroden zu funktionalisieren wurde auf die Goldschicht der Gegenelektroden zusätzlich eine Platinschicht (ca. 50 nm) aufgebracht. Thiole binden zwar auch auf Platin. Die formierten SAMs zeigen jedoch Defekte und eine niedrigere Ordnung und Stabilität^[140–142], was einen erhöhten Oberflächenwiderstand der modifizierten Goldarbeitselektroden verglichen mit den Gegenelektroden sicherte. Zusammen mit der zehnfach größeren Fläche der Gegenelektroden gewährleistete dies, dass die elektrochemisch detektieren Änderungen an der Biosensoroberfläche hauptsächlich von Vorgängen an der Arbeitselektrode herrührten.

Die Goldschicht für die Elektroden und Leiterbahnen des 9WPtE-Chips konnte nicht direkt durch Sputtern auf das Borosilikatsubstrat aufgebracht werden, da Gold keine ausreichende Haftung auf Glas zeigt. Borosilikat ist eine oxidierte Oberfläche. Nicht spontan oxidierende Edelmetalle wie Gold haften darauf schlecht, weil sie keine verbindende Oxidschicht zum Glas bilden können^[143,144]. Gold ist sehr elektronegativ, wodurch es zur Abstoßung zwischen Gold und dem Sauerstoff kommt, der ebenfalls stark elektronegativ ist. Deswegen wird vor dem Edelmetall eine dünne Schicht eines oxidierenden Metalls wie Chrom, Titan oder Nickel oder ein Metalloxid wie Indiumzinnoxid (ITO) aufgetragen. Diese Metalle bzw. Metalloxide bilden Mischoxide an der Substrat-Metall/Metalloxid-Grenze und zeigen dadurch eine bessere Adhärenz an die oxidierte Substratoberfläche^[145].

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Haftvermittler, Chrom und ITO, verwendet. Die damit hergestellten Elektroden wurden hinsichtlich der Oberflächentopographie, der elektrochemischen Eigenschaften und der Haftung der Metallschichten verglichen. So zeigten die ca. 50 nm dicken Haftvermittlerschichten alleine eine unterschiedliche Ober-

flächenrauigkeit. Mittels Rasterkraftmikroskopie wurde für Chrom eine mittlere Rauigkeit r_a von $0,75 \pm 0,04$ nm bestimmt. Die ebenfalls ca. 50 nm dicke ITO-Schicht besaß hingegen mit $0,47 \pm 0,06$ nm eine geringere Rauigkeit. Die AFM-Aufnahmen für Chromoberflächen zeigten eine körnige Topographie, die für die ITO-Oberflächen nicht beobachtet wurde. Allerdings wurde der Rauigkeitsunterschied zwischen den Haftvermittlern durch nachfolgendes Auftragen von ca. 500 nm Gold ausgeglichen. Die Cr- und ITO-basierten Oberflächen der Goldarbeits-elektroden waren ununterscheidbar und besaßen eine mittlere Rauigkeit von $1,9 \pm 0,4$ nm.

Elektrochemisch konnten nur vernachlässigbar geringe Unterschiede zwischen den auf Cr und ITO basierenden Elektroden nachgewiesen werden. Jedoch existierten Unterschiede in der Haftung der Goldschichten bei mehrmaligem Benutzen und Recyceln (Abb. 28). Die Elektroden mit Cr als Haftvermittler zeigten schon nach maximal drei Nutzungen Defekte. Die Goldschicht der Elektroden löste sich vom Chrom, wodurch die Elektroden unbrauchbar wurden. Außerdem zeigte die Goldschicht der Kontaktpads an den Stellen starke Abnutzung, wo die Kontaktstifte des Chipadapters aufsetzten, was die Kontaktierbarkeit der Elektroden verminderte. Hingegen konnten diese Defekte und Abnutzungserscheinungen bei den Elektroden mit ITO als Haftvermittler selbst nach zwanzig Nutzungen nicht beobachtet werden. Erklären lässt sich dieser Unterschied damit, dass die Chromoberflächen durch Kontakt mit atmosphärischem Sauerstoff oxidiert wurden, bevor die Goldschicht aufgetragen wurde. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass nur die Haftung zwischen Gold und Chrom, nicht die zwischen Chrom und dem Borosilikat, beeinträchtigt war. Nach dem Cr-Sputterprozess wurde zum Austausch des Chrom-*Targets* mit dem Gold-*Target* die Vakuumkammer geöffnet. In diesem Zeitraum wurde die Chromoberfläche oxidiert. Die Oxidschicht könnte der Grund für die geringe Haftungsdauer zwischen den Gold- und den Chromschichten gewesen sein. Normalerweise verbindet sich Gold beim Sputtern mit der darunter liegenden Chromschicht, indem sich an der Grenzfläche eine Legierung ausbildet. Dieser Vorgang wird durch eine Chromoxidschicht behindert. Allerdings zeigte Gold eine langlebige Haftung zum Halbleiter ITO, einem Mischoxid aus 90 % w/w Indiumoxid (In_2O_3) und 10 % w/w Zinnoxid (SnO_2). An der Grenzfläche zwischen Gold und ITO konnte sich möglicherweise deswegen eine Art Legierung ausbilden, weil der Sauerstoff bei ITO in die Kristallstruktur eingebunden ist, was bei einer oxidierten Chromoberfläche nicht der Fall ist. ITO besitzt freie Elektronen, die eine Verbindung mit dem elektronegativen Gold ermöglichten.

5.3.3 Verzicht auf die Leiterbahnisolierung

Um definierte, gleichgroße Elektrodenflächen zu erreichen, werden die Leiterbahnen eines Elektrodenchips üblicherweise isoliert, d. h. mit einer elektrisch isolierenden Schicht bedeckt, wodurch sie keinen Kontakt zum Elektrolyten haben. Die Art der Isolierung hängt dabei von der Bauweise des Chips ab. Auf Silizium basierende Chips können z. B. durch thermische

Bildung von Siliziumdioxid oder durch chemische Gasphasenabscheidung von Siliziumnitrid elektrisch isoliert werden. Bei Glassubstraten, wie dem in der Arbeit verwendeten Borsilikat, werden hauptsächlich passivierende Lacke verwendet. Für den 9WPtE-Chip wurde SU8-Isolierungslack verwendet. Dieser Lack beinhaltet ein Epoxidharz als Grundharz, dessen Moleküle je acht Epoxygruppen tragen, die der Polymerisierung dienen. In der Lacklösung befindet sich eine lichtempfindliche Komponente (Triarylsulfoniumhexafluoroantimonat), die unter UV-Anregung eine starke Säure bildet (Hexafluoroantimonsäure), welche die Quervernetzung der SU8-Moleküle katalysiert. Hitze unterstützt diese Reaktion. Da sich der Lack an den belichteten Stellen verfestigt, wird er im Vergleich zum verwendeten Strukturierungslack AR-P 3510 als Negativlack bezeichnet.

In der Arbeit wurden die 9WPtE-Chips bis auf die Elektroden und Kontaktpads mit SU8-Lack isoliert. Das polymerisierte Epoxidharz zeigte allerdings keine ausreichende Beständigkeit gegenüber Piranha-Lösung, die für das Recycling der Elektroden verwendet wurde. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob der Verzicht auf den SU8-Lack trotzdem vergleichbare Messergebnisse zulassen würde. Ohne SU8 vergrößerte sich die effektive Fläche der Arbeitselektroden um die Leiterbahnflächen, die sich innerhalb der *wells* befanden. Dadurch unterschieden sich die Flächen der Arbeitselektroden eines Chips ohne SU8-Lack um 3 % zwischen Elektroden mit gewinkelter und denen mit gerader Leiterbahn im *well* (siehe Abb. 30B). Dieser geringfügige Unterschied hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die elektrochemischen Messungen. Hingegen wurden deutliche Unterschiede zwischen den Elektroden mit und denen ohne SU8 beobachtet. Die Elektroden ohne SU8 besaßen durch die frei-liegenden Leiterbahnen eine um ca. 30 % vergrößerte Fläche. Zykelvoltammetrisch äußerte sich das in größeren Peakstromstärken und impedimetrisch in einer höheren Kapazität (A des CPE) und geringeren Werten für den Lösungsmittelwiderstand und den Warburgkoeffizienten (siehe 4.5.1.3). Diese Änderungen waren so erwartet worden, da die benannten Parameter sich entweder direkt ($I_{p,a}$, $I_{p,k}$, A) oder indirekt (R_s , σ) proportional zur Elektrodenfläche verhalten. Somit bewirkte die Vergrößerung der Elektrodenfläche sogar eine Verbesserung der CV- und Impedanzsignale hinsichtlich größerem Stromfluss bzw. niedrigerer Impedanz.

5.3.4 Reproduzierbarkeit der Impedanzmessungen

Bevor die 9WPtE-Elektrodenarraychips für den Aufbau von Biosensoren verwendet wurden, wurde getestet, ob die Impedanzmessungen mit den Elektroden reproduzierbare Ergebnisse liefern. Damit sollte sichergestellt werden, dass Unterschiede in den Messwerten nicht auf Variationen in der Elektroden-, Chip-, oder Chargenqualität zurückzuführen sind, sondern auf tatsächliche Modifikationen an der Elektrodenoberfläche, z. B. auf die Bindung des Analyten.

Bei der Chipfertigung konnten maximal 4 Chips gleichzeitig hergestellt werden. Jede Produktionseinheit (Charge) wurde nach der Herstellung impedimetrisch vermessen. Von Charge

zu Charge gab es nur geringe Unterschiede (siehe Tab. 10). Die Streuung der Impedanzparameter innerhalb der Chargen war ähnlich groß wie die Streuung innerhalb eines Chips (Tab. 10 und Tab. 11 im Vergleich). Die größten Streuungen zeigten sich beim R_{ct} und beim CPE Parameter A . Hier lag die Standardabweichung innerhalb der Chargen und der einzelnen Chips bei ca. 20 % des Messwertes, bei den anderen Parametern (R_s , n und σ) lediglich bei ca. 5 %. Ein Grund für die Unterschiede zwischen den Chargen und die Streuung der Impedanzparameter innerhalb einer Charge und innerhalb eines Chips konnte nicht bestimmt werden. Unterschiede in der Schichtdicke der Elektroden konnten als Ursache ausgeschlossen werden. Es bestand keine Korrelation der Impedanzparameter mit der Schichtdicke. Auch Messartefakte konnten als Verursacher der Streuung zwischen den Elektroden ausgeschlossen werden. Bei mehrmaligem Messen an einer und derselben Elektrode im Abstand von 10 min wurden keine Abweichungen in den Messwerten beobachtet (siehe Tab. 12). Die 3 % Unterschied in der Elektrodenfläche durch Weglassen der SU8-Isolierung bewirkten ebenfalls keine größere Streuung der Impedanzparameter (Tab. 9). Auch die geometrische Anordnung der Elektroden auf dem Array spielte keine Rolle. Je nach Position der Elektroden auf dem Chip besaßen diese unterschiedlich lange Leiterbahnen (siehe Abb. 15A). Wurden Elektroden verschiedener Chips mit gleicher Array-Position betrachtet, waren die Standardabweichungen der Impedanzparameter nicht geringer als die innerhalb eines Chips oder innerhalb der Chargen. Ein Grund für die Streuung von R_{ct} und A konnte demnach nicht identifiziert werden. Es können nur unbekannte Varianzen in der Rauigkeit (Mikrostrukturierung) der Elektroden vermutet werden.

Verglichen mit anderen Arbeiten waren die Standardabweichungen für die Impedanzparameter allerdings nicht ungewöhnlich hoch. Moulton und Barisci *et al.* haben beispielsweise für saubere Goldscheibenelektroden von BASi (MF-2014, \varnothing 5 mm) eine Standardabweichung für die Kapazität von 10 % bestimmt und Liu und Duckworth *et al.* für BASi-Goldscheibenelektroden mit 3 mm Durchmesser sogar über 30 %^[70,146]. Für den Ladungstransferwiderstand haben Shervedani und Mehrjardi *et al.* mit polykristallinen Goldarbeits-elektroden (Azar electrode Co. Urmia, \varnothing 2 mm) eine Standardabweichung von 15 % bezogen auf die Messwerte ermittelt^[42].

Da die Funktionalisierung der Elektroden zum Aufbau von Biosensoren einen um mehrere Größenordnungen stärkeren Einfluss auf die Impedanzparameter hatte (siehe Kapitel 4.6) als die produktionsbedingten Varianzen, war die Streuung der Messwerte der sauberen Elektroden akzeptabel. Soll jedoch ein Einfluss der Streuung auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher vermieden werden, kann dies durch eine Normierung der Messdaten erreicht werden. Diese Möglichkeit wird in vielen Arbeiten zu impedimetrischen Biosensoren genutzt^[9,36,116,147]. In dieser Arbeit wurden dafür die gemessenen Impedanzparameter zu einem bestimmten Zeitpunkt auf einen vergleichbaren Ausgangswert bezogen (Formel 31). Vom Wert zu einem bestimmten Zeitpunkt wurde der Ausgangswert abgezogen und diese Differenz durch den Aus-

gangswert dividiert. Erst die so erhaltenen Relativwerte für den entsprechenden Impedanzparameter wurden verglichen.

5.3.5 Wiederverwendbarkeit der 9WPtE-Chips

Eine Wiederverwendbarkeit von Messelektroden würde eine Minimierung des Produktionsaufwands (Zeit und Kosten) ermöglichen. Dies ist nicht nur bei kommerziell erhältlichen Messelektroden oder Elektrodenarrays von Interesse. Auch in dieser Arbeit wurde eine Reinigungsprozedur etabliert, mit der die Elektroden des 9WPtE-Elektrodenarraychips für mehrmalige Verwendung recycelt werden können.

Beim Recycling der Elektroden müssen durch vorherige Verwendung aufgebrachte Objekte, wie Moleküle, Verunreinigungen aus dem Elektrolyten oder der Luft oder gar Zellen von der Elektrodenoberfläche entfernt werden. Dazu können z. B. enzymatische, mechanische, chemische, photochemische oder elektrochemische Reinigungsmethoden verwendet werden. Werden Zellen oder Proteine auf die Elektroden aufgebracht, können diese durch enzymatischen Abbau, z. B. durch Trypsin, abgelöst werden^[53,55,56,59]. Dabei werden sowohl die freien Proteine auf den Elektroden gespalten (bei Trypsin immer nach Arginin und Lysin) als auch Proteine der extrazellulären Matrix der Zellen, die die Adhärenz vermitteln. Mechanisch können die Elektroden durch Polieren mit Aluminiumpaste (Al_2O_3)^[11,29,38] oder Ultraschallbehandlung^[18,53,55,57] in Wasser, organischen Lösungsmitteln oder speziellen Reinigungslösungen recycelt werden. Meist werden auch Kombinationen beider Techniken angewandt^[23–25,32,116]. Chemische Reinigung wird z. B. mit Piranha-Lösung (Mischung aus 95 %iger Schwefelsäure und 30 %iger Wasserstoffperoxidlösung) durchgeführt^[24,25,33,39,116]. Piranha-Lösung wirkt stark oxidierend und entfernt alle organischen Verunreinigungen. Zusätzlich zur Behandlung mit Piranha-Lösung wird meist noch mit Aceton, Isopropanol und/oder Ethanol gereinigt^[18,24,33,39,116]. Für die chemische Reinigung wird auch eine Mischung aus Ammoniak, Wasserstoffperoxid und Wasser verwendet^[10,11,148], die wie Piranha-Lösung oxidierend wirkt. Weitere Reinigungschemikalien sind die reduzierend wirkenden Basen NaOH^[7,33] und KOH^[25] und die oxidierend wirkenden Säuren H_2SO_4 ^[25,57], HNO_3 ^[25] und HCl ^[7,33]. Mechanische und chemische Methoden werden oft auch ergänzend verwendet^[10,18,25,38]. Eine photochemische Methode zur Reinigung von mit Gold beschichteten Substraten haben Bonroy und Frederix *et al.* verwendet. Mit Hilfe der UV-Strahlung einer Quecksilbergaslampe haben sie Ozon aus atmosphärischem Sauerstoff gebildet und damit oxidativ organische Rückstände von den Elektroden entfernt. Auch elektrochemisch können Elektrodenoberflächen recycelt werden. Dazu werden beispielsweise Zyklovoltammogramme über ausgedehnte Potentialbereiche in wässrigen Lösungen von H_2SO_4 ^[11,25,39,42] oder HClO_4 ^[11,24,116] aufgezeichnet. Während des Potentialsweeps werden Verunreinigungen durch Oxidation bzw. Reduktion entfernt, was anhand der Veränderungen der Form der Zyklovoltammogramme verfolgt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Reinigungsmethoden kombiniert. Elektroden, die mit Proteinen oder Zellen in Kontakt gekommen waren, wurden zuerst enzymatisch mittels Trypsin gereinigt und dann mit Wasser und Ethanol gespült. Alle Elektroden wurden außerdem mit Aceton und Piranha-Lösung (2:1 95 %ige Schwefelsäure und 30 %ige Wasserstoffperoxidlösung) chemisch behandelt. Mechanische Reinigungsmethoden, bei denen relativ starke Kräfte auf die Metallstrukturen wirken würden oder Verlust an Elektrodenmaterial durch Abrieb möglich war, wurden nicht angewandt. Eine Beschädigung der gesputterten Elektroden sollte dadurch vermieden werden. Allerdings wurden die Elektroden nach der enzymatischen und/oder chemischen Reinigung abschließend zykvoltammetrisch in der entsprechenden Messlösung gereinigt. Dafür wurden Zykvoltammogramme zwischen 0,8 und -0,8 V (gegen Ag/AgCl) solange aufgezeichnet bis sich die Messung stabilisierte (mindestens 3 Zyklen).

Die gereinigten Elektroden wurden mittels Rasterkraftmikroskopie, Zykvoltammetrie und Impedanzspektroskopie auf Veränderung untersucht. Selbst nach 15-20 Nutzungen zeigten die mit HF gesputterten Goldarbeitselektroden des 9WPtE nur eine geringe Zunahme der mittleren Rauigkeit von $1,9 \pm 0,4$ auf $4,0 \pm 1,0$ nm. Elektrochemisch wurden, verglichen mit den starken Veränderungen bei Variation der Leitsalz- und Redoxionenkonzentration (z. B. Anstieg um 400 % für $I_{p,a}$ und $I_{p,k}$ bei Erhöhung der c_{FeCy} von 1 auf 5 mM), ebenfalls nur geringe Veränderungen beobachtet. So nahmen in den zykvoltammetrischen Messungen die Peakstromstärken um ca. 10 % ab und die Peakseparation um ca. 15 % zu. Impedimetrisch nahm vor allem der Ladungstransferwiderstand um ca. 60 % zu, wahrscheinlich durch Verunreinigungen der Elektrodenoberflächen, die trotz Recycling nicht entfernt werden konnten oder durch Schäden in den Metallschichten. Allerdings lagen die Standardabweichungen für die relative Änderung von R_{ct} alleine schon bei ca. ± 25 %.

In anderen wissenschaftlichen Arbeiten wurden mechanische, chemische oder elektrochemische Reinigungsmethoden meist als Initialreinigung der Elektroden beschrieben und seltener als Recyclingprozedur. Es existieren nur wenige Arbeiten über die Veränderungen von Messelektroden durch mehrmaliges Verwenden bzw. Recyclen. Allerdings geben die wenigen existenten Studien ebenfalls Signalverluste in vergleichbaren Größenordnungen für die CV-Peakstromstärken an und das auch schon bei einmaliger Nutzung der Elektroden^[117,149]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Elektrodenrecycling legen nahe, dass trotz geringer Signalverluste jede Elektrode mindestens zwanzig Mal genutzt werden kann, bzw. dass, falls nötig, die Signalverluste durch eine Erhöhung der Ionenkonzentration im Messelektrolyten ausgeglichen werden können.

5.4 Stabile Immobilisierung von Proteinen auf den Goldelektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips durch Chemoligation mit Thiol-SAMs

Der Aufbau von Biosensoren erfordert die stabile Kopplung der biologischen Erkennungskomponente an den Signalwandler. Die Kopplungsstrategien richten sich nach der Art der biologischen Komponente und des Signalwandlers. In der vorliegenden Arbeit sollten Proteine sowohl an die Goldelektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips als auch an die Goldelektroden der speziell für die Detektion von Partikeln bzw. Zellen gefertigten Sensorobjektträger (siehe 5.6) immobilisiert werden. Dazu standen verschieden kovalente und nicht-kovalente Techniken zur Verfügung (siehe Kapitel 1.4). Die Entscheidung fiel auf die Chemoligation mittels Thiolen. Dafür werden Thiole in Lösung auf die Goldelektroden aufgebracht, wo sie über einen gewissen Zeitraum sich selbst-organisierende Monoschichten (*self-assembled monolayer*, SAM) bilden. Die Thiolgruppen reagieren mit dem Gold zu einer stabilen Organoschwefelverbindung mit kovalentem Bindungscharakter. Dieser Vorgang wird als Chemisorption bezeichnet. An den gebildeten SAM werden dann die Proteine kovalent gekoppelt (Abb. 39). Dazu können Carboxylgruppen der Thiole oder der zu immobilisierenden Proteine zu NHS-Estern umgewandelt werden, die in einem weiteren Schritt entsprechend mit den primären Aminen der Proteine bzw. Thiole reagieren. Die dadurch gebildete Amidbindung sichert den stabilen Verbleib der Proteine auf der Elektrode.

5.4.1 Bildung stabiler, sich selbst-organisierender Thiolschichten

Thiole zählen zu den am intensivsten untersuchten Substanzen zur Bildung sich selbst-organisierender Monoschichten. Ihr Vorteil zur Funktionalisierung von Goldoberflächen liegt in ihrer einfachen Präparation (keine besonderen Umgebungsbedingungen/Geräte nötig), in ihrer starken Affinität zu Gold, in ihrer hohen strukturellen Ordnung und in ihrer Flexibilität in den funktionellen Gruppen. Sie formieren sich auf Objekten unterschiedlichster Form und Größe und bilden durch ihre hohe Löslichkeit ausschließlich Monoschichten über Metall-Thiolat-Bindungen (S-Au-Bindungen^[150,151]). Wohingegen beispielsweise Disulfide eine geringere Löslichkeit besitzen, was zu Präzipitat- und Multischichtenbildung führen kann.^[83,139]

Die Formierung von Thiol-SAMs verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt, der nur wenige Sekunden dauert, lagern sich die Thiole an, bilden die Thiolat-Gold-Bindung aus und richten sich auf bis zu 90 % ihrer maximalen Höhe aus. In einem zweiten langsameren Schritt, der mehrere Stunden dauert, ordnen sich die Moleküle weiter aus und die Thiol-SAM-Schicht erreicht ihre endgültige Dicke, Dichte und Stabilität durch van-der-waals Wechselwirkungen der Methylengruppen.^[83,152] Die zeitliche Stabilität der Thiol-SAMs hängt von vielen Faktoren ab, von denen einige im folgenden näher erläutert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Thiol-Kettenlänge und des Lösungsmittels auf die zeitliche Stabilität der Thiol-SAMs untersucht. Dafür wurden Thiole mit unterschiedlicher Kettenlänge eingesetzt: 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) mit elf C-Atomen, 3-Mercaptopropionsäure (MPA) mit drei C-Atomen und Cysteamin mit lediglich zwei C-Atomen, wobei letzteres statt einer Säurefunktion ein primäres Amin besitzt. Zusätzlich wurde eine 1:10 Mischung aus 11-Mercaptoundekansäure und 6-Mercaptohexanol (MHO, sechs C-Atome) getestet. Der Einfluss des Lösungsmittels wurde für MPA untersucht, da dieses Thiol sowohl in Ethanol als auch in Wasser löslich ist. Die Thiole bzw. Thiolmischungen wurden gelöst in Ethanol bzw. Wasser (MPA) auf den Goldelektroden der 9WPtE-Elektrodenarraychips inkubiert. Die dabei gebildeten selbst-organisierende Monoschichten wurden im Anschluss elektrochemisch analysiert.

Ein entscheidender Aspekt für die Formierung stabiler, defekt-freier SAMs auf Gold ist die Ebenheit und Sauberkeit der Goldoberfläche. Deswegen wurde in dieser Arbeit anhand von rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen das Sputtern der Metallschichten mittels HF dem DC-Sputtern vorgezogen, weil die mittlere Rauigkeit für HF nur halb so groß war wie für DC (siehe Kapitel 5.3.2). Unebenheiten der Goldschicht hätten sich in Defekten der Thiol-schicht widerspiegelt. Genauso wurde großen Wert auf die Reinigung bzw. das Recycling der Elektroden gelegt (siehe Kapitel 5.3.5). Die Elektroden wurden immer unmittelbar vor dem Aufbau der Thiol-SAMs chemisch und zykvoltammetrisch gereinigt, um neue Kontaminationen, verursacht durch eine längere Lagerung, zu beseitigen. Verunreinigungen verlangsamten die Kinetik der SAM-Formierung, da die Fremdmoleküle erst von der Oberfläche desorbieren müssen^[139]. Als Inkubationszeit für die Thiollösungen wurde, mit Ausnahme der Versuche basierend auf dem Sensorobjektträger, 18 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die Reorganisation und Verdichtung der SAMs vollständig abgeschlossen sein sollte und Defekte minimiert sein sollten^[139]. Für die Sensorobjektträger wurde mit 3 h eine kürzere Inkubationszeit gewählt, um die Gesamtversuchszeit auf maximal 6 h zu verkürzen (Kapitel 3.6.1). Dabei sind 3 h Thiolinkubation ein guter Kompromiss, da diese Zeit ausreicht, um auf sauberen Elektroden reproduzierbare SAM-Eigenschaften zu gewährleisten^[139]. Alle Elektroden, auch die des Sensorobjektträgers, wurden bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) mit den Thiollösungen inkubiert, weil zu niedrige Temperaturen die Kinetik der SAM-Bildung verschlechtern^[139]. Die Defekte wären bei gleicher Inkubationszeit größer gewesen und eventuell vorhandene Verunreinigungen bzw. Lösungsmittelmoleküle wären schlechter desorbiert. Ein weiterer Parameter, der Einfluss auf die benötigte Inkubationszeit hat, ist die Konzentration des jeweiligen Thiols. Inkubationszeit und Konzentration verhalten sich indirekt proportional zueinander. Werden niedrige Konzentrationen eingesetzt, muss die Zeit für die Inkubation erhöht werden. Für eine maximale Bedeckung der Goldoberfläche mit Alkanthiolen sind ca. 10^{14} Moleküle nötig, was einer Mindestkonzentration von ca. 1 μM entspricht^[153–155]. Um einen stabilen SAM in

praktikabler Zeit zu generieren ist allerdings ein vielfaches der Mindestkonzentration nötig. Daher wurde als Thiolkonzentration in dieser Arbeit immer 1 mM eingesetzt.

CV- und Impedanzmessungen belegten die hohe Ordnung und Stabilität der MUDA-SAMs auf den Arbeitselektroden. Im Zyklovoltammogramm konnte für die mit MUDA behandelten Elektroden kein Faradayscher Stromfluss gemessen werden. Die Moleküle bildeten eine dichte, isolierende Schicht, die die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid hemmte. Dabei wirkten die Carbonsäurereste der MUDA-Moleküle zusätzlich abstoßend auf die negativ geladenen Redoxionen. Impedimetrisch wurde die Formierung eines geordneten MUDA-SAMs und die dadurch gehemmte Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid durch eine Zunahme des Ladungstransferwiderstands (R_{ct}) um drei Größenordnungen bestätigt. Die mit der MUDA-SAM-Formierung einhergehende Vergrößerung des Dielektrikums an den Elektroden spiegelte sich in einer Abnahme des CPE-Parameters A um mehr als eine Größenordnung wider. Über 72 h Lagerung der Elektroden mit MUDA-SAMs in PBS wurde eine Steigerung der Ordnung der MUDA-Moleküle anhand der Verdopplung von R_{ct} und einer weiteren Abnahme von A beobachtet. Die MUDA-SAMs waren demnach auf Gold über 72 h stabil. Es wurden keine Desorptionsprozesse detektiert.

Die Thiolmischung aus MUDA und MHO bewirkte verglichen mit MUDA allein eine geringere Zunahme von R_{ct} und auch eine geringere Abnahme von A . Dies lässt sich auf den hohen Anteil von MHO mit nur 6 Kohlenstoffatomen zurückführen. Die Hemmung der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid fiel einerseits durch den dünneren SAM und andererseits durch die schwächere negative Ladung (MHO nur polar) geringer aus. Die SAMs aus MUDA/MHO waren im Unterschied zu den MUDA-SAMs auch zeitlich instabiler. Der R_{ct} nahm von 24 auf 48 h Lagerung in PBS wieder ab und A zu, was auf Desorption der Thiole oder Defekte im SAM zurückgeführt werden kann.

Neben der langkettigen 11-Mercaptoundekansäure und der Mischung aus 11-Mercaptoundekansäure und 6-Mercaptohexanol wurde auch ein kurzkettiges Thiol, 3-Mercaptopropionsäure, zum Aufbau von SAMs verwendet. Vorteil von MPA im Vergleich zu den längerkettigen Thiolen ist die Löslichkeit in Wasser. Da die 9WPtE-Elektrodenarraychips zum Aufbau der SAMs jedes Mal mehrere Stunden in die Thiollösung getaucht wurden, bestand bei mehrmaligem Verwenden der Chips das Risiko, dass sich die mit Silikon aufgeklebten Kavitäten durch Ethanoleinwirkung lösen. Außerdem musste der Chip nach der Thiolinkubation vom Ethanol befreit werden, weil die folgenden Inkubationsschritte in wässrigem Milieu stattfinden. Durchgehendes Arbeiten in wässrigem Milieu würde daher entsprechende Waschschrte und die Gefahr der Denaturierung der Proteine durch Ethanolreste verringern. In dieser Arbeit wurde MPA sowohl in Ethanol als auch in Wasser gelöst eingesetzt, um den Einfluss des Lösungsmittels zu testen. Unabhängig vom Lösungsmittel fiel die Hemmung der Redoxreaktion nach MPA-Inkubation wesentlich geringer aus, als nach Inkubation mit MUDA oder

MUDA/MHO. R_{ct} erhöhte sich nach der MPA-Inkubation nur um ca. eine Größenordnung und A sank nicht mal um eine Größenordnung ab. Diese Beobachtungen lassen sich durch die, verglichen mit MUDA- und MUDA/MHO-SAMs, geringe Dicke des Dielektrikums erklären. MPA besitzt nur drei Kohlenstoffatome und bildet dadurch dünnere SAMs. Deren Stabilität ist darüber hinaus noch geringer als für MUDA/MHO-SAMs. Schon nach 24 h Lagerung können Abbauprozesse bzw. Defekte in Form einer starken Abnahme von R_{ct} und einer Zunahme von A beobachtet werden. Die in wässrigem Milieu gebildeten SAMs zeigten einen geringfügig niedrigeren Wert für R_{ct} und einen höheren für A , allerdings glichen sich die Werte für Wasser und Ethanol über die Lagerzeit von 48 h an. Der Unterschied beruhte vermutlich auf einer schlechteren Ordnung oder größeren Defekten der in Wasser gebildete MPA-SAMs verglichen mit den in Ethanol gebildeten SAMs.

Cysteamin unterscheidet sich von den anderen verwendeten Thiolen einerseits durch eine Kettenlänge von nur 2 C-Atomen und andererseits durch eine primäre Aminogruppe mit positiver Ladung in der Messlösung ($\text{p}K_{\text{a}}$ 8,27). Alle anderen verwendeten Thiole trugen Carboxylreste mit negativer Ladung. Die positive Ladung durch das primäre Amin resultierte nach Bildung von Cysteamin-SAMs in einem geringeren Wert für R_{ct} im Vergleich zur sauberen Elektrode. Der positiv geladene Cysteamin-SAM wirkte vermutlich anziehend auf die negativ geladenen Ferri-/Ferrocyanidionen. A nahm hingegen wie bei den anderen Thiolen ab, weil die Dicke des Dielektrikums mit SAM-Bildung zunahm. Die Stabilität der Cysteamin-SAMs war ähnlich gering wie die der MPA-SAMs. Schon nach 24 h Lagerung näherten sich die gemessenen Werte für die Impedanzparameter R_{ct} und A wieder den Werten der sauberen Elektroden an, was auf einen Abbau des Cysteamin-SAM hindeutete.

Die Hemmung der Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid nimmt mit sinkender SAM-Dicke ab, folglich mit sinkender Anzahl an C-Atomen. Dies konnte impedimetrisch nachgewiesen werden. Mittels Impedanzspektroskopie konnte aber auch eine Abnahme der Stabilität der selbst-organisierenden Thiolmonoschichten mit sinkender Kettenlänge beobachtet werden. Dies bestätigte frühere Untersuchungen zum Einfluss der Kettenlänge, die für kürzere Thiole geneigtere, weniger dicht gepackte, ungeordnetere SAMs mit geringerer thermischer Stabilität beobachteten^[83,152,155]. Bei kürzeren Thiolen sind die Interaktionen zwischen den Alkylketten (van-der-waals-Kräfte) schwächer^[156,157]. Es herrscht eine geringere Ordnung innerhalb und zwischen den Ketten. Ab einer Kettenlänge von ca. zehn Kohlenstoffatomen werden die SAM-Eigenschaften nicht mehr von der Kettenlänge bestimmt^[83,155]. Von den in dieser Arbeit verwendeten Thiolen wurden nur mit MUDA (11 C-Atome) ausreichend stabile SAMs gebildet. Der Einfluss der kurzen MHO-Ketten in den MUDA/MHO-SAMs war so groß, dass diese wie die kurzkettingen SAMs aus MPA und Cysteamin keine ausreichende zeitliche Stabilität besaßen. Für die weitere Funktionalisierung mit biologischen Erkennungsmolekülen wurden daher nur mit MUDA-SAMs beschichtete Elektroden verwendet.

5.4.2 Stabile Immobilisierung von Antikörpern an Thiol-SAMs

Die Immobilisierung der biologischen Erkennungskomponenten erfolgte wie schon beschrieben durch Chemoligation an einen Thiol-SAM mittels EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) und NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid). Als Thiol wurde 11-Mercaptoundekansäure verwendet, da SAMs dieses Thiols im Vergleich zu anderen Thiol-SAMs die bessere zeitliche Stabilität gezeigt hatten (siehe 5.4.1). Neben der Stabilität der SAMs ist jedoch auch die stabile Aktivität der biologischen Erkennungskomponenten entscheidend für die Qualität eines Biosensors. Um zu testen, ob mit dem gewählten Immobilisierungsverfahren die biologische Aktivität bzw. der native Zustand der Erkennungselemente erhalten bleibt, wurden beispielhaft Antikörper immobilisiert, an die Peroxidase gekoppelt war. Die katalytische Aktivität dieses Enzyms sollte als indirekter Nachweis für die biologische Aktivität der Antikörper dienen. Denn wenn die Aktivität der Peroxidase nicht beeinträchtigt wird, so kann davon ausgegangen werden, dass auch die Antikörper in einem nativen Zustand vorliegen.

Der Nachweis der enzymatischen Aktivität der immobilisierten Peroxidase erfolgte über eine Redoxreaktion, die sonst als Signalverstärkungsreaktion in elektrochemischen Biosensoren angewandt wird^[15,67,158]. Dabei wird das Substrat 3-Amino-9-ethylcarbazol zu 3-Azo-9-ethylcarbazol oxidiert, während Wasserstoffperoxid reduziert wird (Abb. 14). Diese Redoxreaktion wurde allerdings nicht direkt gemessen, sondern die Ablagerung von 3-Azo-9-ethylcarbazol, welches in Wasser einen unlöslichen Niederschlag bildet. Der Niederschlag erhöht den Bedeckungsgrad der Elektrode. Impedimetrisch kann dies als Zunahme des Ladungstransferwiderstands detektiert werden, da die Ferri-/Ferrocyamid-Redoxreaktion gehemmt wird.

Die Elektroden, die mit dem Antikörper-Peroxidase-Konjugat behandelt wurden, zeigten nach dreiminütiger Inkubationszeit mit der Substratlösung (1:1000 3-Amino-9-ethylcarbazol in 5 mM Acetattuffer; 0,003 % Wasserstoffperoxid; pH 5) einen relativen Anstieg des R_{ct} von ca. 350 %. Für die Kontrollelektroden ohne Antikörper-Enzym-Konjugat war der Anstieg nur halb so groß, was auf eine spezifische Steigerung des Ladungstransferwiderstands durch die von der Peroxidase katalysierte Präzipitatbildung hindeutete. Das Vorhandensein von aktiver Peroxidase bedeutete gleichzeitig, dass auch native Antikörpermoleküle vorhanden waren. Durch Chemoligation mit EDC und NHS konnten somit auf den Goldelektroden der 9WPtE-Chips Antikörper mit ausreichender biologischer Aktivität immobilisiert werden. Auf diese Art hergestellte Antikörper- bzw. Proteinfilm dienten im Folgenden der biosensorischen Detektion von Analyten.

Um die Biosensoren auch auf Vorrat herstellen zu können, muss die Stabilität der Antikörper- bzw. Proteinfilm gewährleistet sein. Als Maß für die biologische Stabilität während der Lagerung wurde ebenfalls die Aktivität gekoppelter Peroxidasemoleküle heran gezo-

gen. Auch nach 72 h Lagerung in PBS wurden Peroxidaseaktivität und somit native Antikörper beobachtet. Es wurde sogar eine doppelt so große relative Zunahme des R_{ct} und somit eine stärkere Peroxidaseaktivität als direkt nach der Immobilisierung der Antikörper-Peroxidase-Konjugate gemessen. Die relative Änderung des R_{ct} der Kontrollelektroden vergrößerte sich nicht, was eine spezifische Zunahme der Peroxidaseaktivität der Elektroden mit Antikörper-Peroxidase-Konjugat belegte. Als Grund für diese Zunahme wurde die Äquilibration der Peroxidasemoleküle im PBS angenommen.

5.5 Biosensor zur Detektion von Tenascin C

Tenascin C (TnC) ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das hauptsächlich während der Entwicklung eines Organismus und nicht im adulten Stadium exprimiert wird (siehe Kapitel 1.6)^[97]. Ausnahmen davon sind Tumorgewebe. Tenascin C wird in vielen soliden Tumoren exprimiert, z. B. in Gliomen, Brust-, Ovarial-, Uterus-, Prostata-, Lungen-, Nierenzell-, Leberzell-, Mundhöhlen- und Blasenkarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Melanomen, Osteosarkomen, Chondrosarkomen und auch in malignen Lymphomen. Das TnC-Protein gilt daher als geeigneter Tumormarker für die Diagnostik^[98,99]. Tumorgrad, Prognose und Rezidivrate lassen sich anhand der Expression von Tenascin C ableiten^[99,100].

In der vorliegenden Arbeit sollte ein elektrochemischer Biosensor für den Tumormarker Tenascin C entwickelt werden. Biosensoren haben Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren zur Tumordiagnostik (bildgebende Verfahren, anatomische/histologische/zytologische/molekularbiologische/biochemische Tests). Zum einen sind Biosensoren einfach miniaturisierbar, wodurch weniger Probenmaterial oder Analysereagenzien wie Antikörper benötigt werden und eine höhere Parallelisierung erreicht wird. Zum anderen können Biosensoren als *all-in-one*-Geräte tragbar konstruiert und ihre Anwendung automatisiert werden.

Als Basis für die TnC-Biosensoren dienten die 9WPtE-Elektrodenarraychips. Auf den Goldelektroden der Chips wurden zur Funktionalisierung sich selbst-organisierende Schichten (SAM) aus 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) aufgebracht. Die SAMs aus MUDA waren in vorangegangenen Untersuchungen als die stabilsten hervorgegangen (siehe 5.4.1). Es wurden drei Strategien zum Aufbau von Biosensoren für Tenascin C getestet: ein indirektes, ein *sandwich*- und ein kompetitives Verfahren. Allen Verfahren war gemein, dass die Signalübertragung elektrochemisch mittels Impedanzspektroskopie erfolgte. Dabei wurde, wie in den Versuchen zur Charakterisierung des Messsystems oder zum Aufbau funktioneller Oberflächen, die Redoxreaktion von Ferri-/Ferrocyanid untersucht. Genauer gesagt wurde die Hemmung der Redoxreaktion durch die Erhöhung des Bedeckungsgrads der Elektroden bestimmt. Verursacht wird die höhere Bedeckung der Elektroden durch die Bindung des Analyten oder eine enzymatische Präzipitatbildung als Signalverstärkung. Der Ladungstransferwiderstand R_{ct} , der aus den Im-

pedanzmessungen bestimmt wurde, diente als Parameter zur Quantifizierung der Hemmung des Ferri-/Ferrocyanid-Umsatzes und somit der Bedeckung der Elektrode.

Beim indirekten biosensorischen Testverfahren wurde Tenascin C durch Chemoligation an den MUDA-SAM gebunden und mittels anti-TnC-Antikörpern detektiert. An diese primären Antikörper wurden spezifische Antikörper-Peroxidase-Konjugate gebunden, die eine Signalverstärkung mittels Präzipitattfällung, wie unter 5.4.2 beschrieben, ermöglichen sollten. Jedoch wurde für den indirekten Sensor eine unspezifische Bindung der Primärantikörper beobachtet, denn die Kontrollelektroden ohne TnC und mit anti-TnC-Antikörpern zeigten eine relative Änderung des R_{ct} vergleichbar mit den Elektroden mit TnC und mit anti-TnC-Antikörpern. Die Kontrollen ohne die anti-TnC-Antikörper aber mit den Antikörper-Peroxidase-Konjugaten zeigten, wie erwartet, einen geringeren Anstieg des R_{ct} , der jedoch auch bei der Hälfte der Elektroden mit TnC und primären und sekundären Antikörpern lag.

Um die Spezifität des TnC-Biosensors zu erhöhen, wurde statt der indirekten Methode eine *sandwich*-Strategie getestet. Dabei wurden die anti-TnC-Antikörper als biologische Erkennungskomponenten auf dem Biosensor immobilisiert. Dann wurde der Biosensor mit TnC-Proben inkubiert. Das Signal der Bindung von TnC an die Primärantikörper wurde im Anschluss durch einen weiteren anti-TnC-Antikörper mit anderem Epitop und einem entsprechenden Antikörper-Peroxidase-Konjugat gegen den zweiten anti-TnC-Antikörper verstärkt. Als Verstärkungsreaktion wurde erneut die enzymatisch katalysierte Fällung von 3-Azo-9-ethylcarbazol angewandt. Die relativen Änderungen des Ladungstransferwiderstands für die Kontrollelektroden ohne TnC bzw. die Kontrollen ohne den zweiten anti-TnC-Antikörper waren in etwa halb so groß wie die relative Änderung von R_{ct} für die Elektroden mit dem vollständigen *sandwich* aus erstem anti-TnC-Antikörper, TnC, zweitem TnC-Antikörper und dem Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat.

Ein Signalverhältnis von 1:2 zwischen den Kontrollelektroden und den Elektroden mit TnC und vollständigem *sandwich* bedeutete immer noch keine deutliche Verbesserung der Spezifität des Sensors. Daher wurde noch eine dritte Detektionsmethode, ein kompetitiver Biosensor, entwickelt. Es wurden erneut anti-TnC-Antikörper mittels Chemoligation via MUDA-SAMs auf den Goldarbeitselektroden der 9WPtE-Chips immobilisiert. Dann wurde die TnC-Probe appliziert. In einem dritten Schritt wurde mit Antikörper-Peroxidase-Konjugaten inkubiert, die spezifisch für die anti-TnC-Antikörper waren. Durch die Tenascin C-Bindung wurde jedoch die Bindung der Antikörper-Peroxidase-Konjugaten an die Antikörper auf der Elektrode behindert. Der Nachweis der geringeren Bindung der Antikörper-Peroxidase-Konjugate auf den mit TnC inkubierten Elektroden im Vergleich zu den Kontrollen ohne TnC erfolgte wiederum durch Präzipitattfällung katalysiert von den Peroxidasemolekülen. Die Präzipitatablagerung und damit auch die Zunahme des Bedeckungsgrads sollten für die Kontrollen größer sein, als für Elektroden mit TnC. Als Maß für den Bedeckungsgrad wurde auch hier der Ladungs-

transferwiderstand gewählt. R_{ct} war, wie zu erwarten, für die Kontrollelektroden ohne TnC größer als für die Elektroden mit TnC. Das Signalverhältnis zwischen Elektroden mit und ohne TnC lag bei ca. 1:3. Neben den Pufferkontrollen ohne TnC wurden weitere Kontrollelektroden mitgeführt, bei denen Rinderserumalbumin in äquimolarer Konzentration wie TnC eingesetzt wurde. Eine unspezifische Bindung von BSA wurde nicht beobachtet. Der R_{ct} der BSA-Kontrollelektrode war vergleichbar mit dem der Pufferkontrollelektrode.

Die Signalspezifität des TnC-Biosensors konnte folglich mit dem beschriebenen kompetitiven Verfahren erhöht werden. Um nun auch die Sensitivität des Sensors zu bestimmen, wurde TnC in einer logarithmischen Konzentrationsreihe eingesetzt. Durch nicht-lineare Anpassung des gemessenen R_{ct} gegen die TnC-Konzentration wurde ein Detektionslimit von 7 µg/ml ermittelt. Da nur geringe Volumina der TnC-Proben eingesetzt wurden (2 µl), entsprach dies 14 ng bzw. 48 fmol der monomeren Form des Moleküls. Verglichen mit den TnC-Konzentrationen in tatsächlichem Probenmaterial, wie z. B. 46 µg/ml in Zystenflüssigkeit von Glioblastomen^[159], 29 µg/mg Protein in kolorektalem Karzinomgewebe^[160] und 26 µg/mg Protein in Lebermetastasen^[160], wäre die Sensitivität des elektrochemischen Biosensors ausreichend, um Tumore zu identifizieren.

Die Elektrodenarraychips wurden bis zu zwanzig Mal für den Aufbau der kompetitiven Biosensoren verwendet. Dazu wurden die Oberflächen der Goldarbeits Elektroden nach jeder Nutzung wie unter 3.10 beschrieben recycelt. Das mehrmalige Nutzen bzw. Recyclen hatte keinen Einfluss auf die Signalstärke. Mit Biosensoren auf Basis von frisch hergestellten Elektroden (0-3 Mal verwendet) wurde für eine TnC-Probe von 100 µg/ml verglichen mit bereits 15-20 Mal verwendeten Elektroden kein Unterschied im R_{ct} beobachtet.

Parallel zur Detektion von Tenascin C mit dem kompetitiven Biosensor, wurde ein Immunblot (*Dot Blot*) als ein herkömmliches Diagnostikverfahren mit denselben Antikörpern und TnC-Proben durchgeführt. Der Immunblot war mit einem Detektionslimit von 3-10 µg/ml TnC nicht sensitiver als der kompetitive Biosensor. Das Detektionslimit des TnC-Biosensors war auch vergleichbar mit einem publizierten Testverfahren basierend auf ELISA mit dem Konzentrationen von 0,2 bis 12,5 µg/ml Tenascin C detektiert werden konnten^[161]. Es existieren allerdings auch herkömmliche Testverfahren, mit denen eine höhere Sensitivität bis zu 2 ng/ml erreicht wird, ausreichend um TnC in Serumproben zu detektieren^[162,163]. Trotzdem besitzen herkömmliche Tests beachtliche Nachteile. Es sind komplexe Verfahren, die meist einen kompletten Arbeitstag beanspruchen. Abgesehen vom Thiol-SAM, der auf Vorrat hergestellt werden kann, werden für die Durchführung des kompetitiven biosensorischen Tests lediglich ca. 2 h benötigt. Immunblots und ELISAs benötigen darüber hinaus größere Mengen an Proben und Detektionsreagenzien, wie Antikörper. Die für den in dieser Arbeit entwickelten kompetitive TnC-Biosensor benötigten Proben- und Reagenzienmengen liegen 2-3 Größenordnungen darunter. Wie beim ELISA wurde der Biosensor miniaturisiert (*96-well-*

Maßstab nach ANSI, *American National Standards Institute*, skalierbar) und die einzelnen Probeanalysen parallelisiert (9 wells). Dies kann zukünftig der Automatisierung des kompetitiven Biosensortests dienen, wodurch die Zeitersparnis noch größer wäre. Ein weiterer Vorteil des Biosensors ist die objektive Bestimmung von physikalischen Größen als Messparameter. Beim Auswerten von Immunfärbungen oder Immunblots können die Ergebnisse durch subjektive Einschätzungen beeinträchtigt werden, was eine Vergleichbarkeit erschwert.

5.6 Detektion von ganzen Zellen

Für die Detektion von Proteinen existieren bereits eine Reihe von elektrochemischen Biosensoren^[4,32,68,71,93,116,164]. Jedoch liegen nur wenig Arbeiten zur Detektion von ganzen Zellen vor. Diese beschränken sich hauptsächlich auf Sensoren für Bakterienzellen^[8–12]. Die wenigen Sensoren für eukaryotische Zellen sind entweder für Suspensionszellen entwickelt worden oder die Signalwandlung findet nicht elektrochemisch statt, sondern optisch^[13,14,108]. Die geringe Zahl an Publikationen über Biosensoren für ganze Zellen beruht sicherlich auf der Komplexität von Zellen verglichen mit z. B. Proteinmolekülen. Zellimmobilisierung erfordert zum einen stärkere Bindungskräfte zwischen den Erkennungsmolekülen und den Zellen, da wesentlich größere mechanischen Kräfte wirken. Zum anderen müssen die Bindungsereignisse spezifisch sein, d. h. eine unspezifische Adhärenz der Zellen muss verhindert werden. Dies ist vor allem für die Detektion von unter normalen Umständen adherenten Zellen ein Problem.

In der vorliegenden Arbeit sollte basierend auf den 9WPtE-Elektrodenarrays ein Biosensor zur Detektion von ganzen Zellen entwickelt werden. Mittels Polystyrolpartikeln sollte im Vorfeld die Machbarkeit getestet werden. Die Partikel hatten als Modellsystem den Vorteil, dass sie mit einem Durchmesser von 2 µm nicht wesentlich kleiner jedoch weniger komplex als Zellen waren. So trugen sie nur eine Art Oberflächenprotein: fluoreszenzmarkierte Antikörper. Über die Fluoreszenz der Antikörper ließ sich die Partikelbindung mikroskopisch mitverfolgen. Für den Partikelsensor wurden Antikörper gegen die fluoreszierenden Partikelantikörper auf den Goldelektroden der 9WPtE-Chips immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgte analog zum TnC-Sensor (siehe 5.5) mittels MUDA-SAM und Chemoligation der durch EDC und NHS aktivierten Carboxylfunktionen der MUDA-Moleküle mit primären Aminen der Antikörper. Der so gefertigte Biosensor wurde zur Detektion der Partikel aus einer Suspension verwendet. Dabei konnte mikroskopisch ein Anstieg der Spezifität der Partikelbindung mit steigender Konzentration von Rinder Serumalbumin in der Suspension beobachtet werden (siehe 4.8.1.1). Impedimetrisch wurde hingegen kein signifikanter Unterschied im Ladungstransferwiderstand zwischen den Elektroden mit Antikörpern und den Kontrollelektroden ohne Antikörper gemessen (siehe 4.8.1.2). Der Unterschied im Bedeckungsgrad durch die bis zu fünf Mal höhere Partikelzahl auf den Elektroden mit Antikörpern war nicht ausreichend für eine messbarer

Änderung des R_{ct} . Als Grund dafür wurden Lücken in der immobilisierten Partikelschicht angenommen. Ähnlich wie die Impedanz einer Elektrode mit Thiolsschicht hauptsächlich von Defekten in dieser Schicht bestimmt wird^[137], bestimmten Lücken in der Schicht der immobilisierten Partikel die Impedanz. Da die Partikel selbst auf den Elektroden mit Antikörpern nur einen geringen Teil der Fläche bedeckten, waren viele Freiräume vorhanden. Der Strom bevorzugt aber den Weg des geringsten Widerstands. Dies ergibt sich aus den Kirchhoffschen Gesetzen^[165]. Der Weg des geringsten Widerstands entsprach in diesem Fall den Freiräumen in der Partikelschicht. Zwischen Elektroden mit 500 und solchen mit nur 100 Partikeln pro mm^2 wurde folglich kein Impedanzunterschied gemessen, weil bei beiden enorme Lücken in der Partikelschicht vorhanden waren. Der Anteil der bedeckten Elektrodenfläche betrug für Elektroden ohne Antikörper nur ca. 0,03 %, für Elektroden mit Antikörpern aber auch lediglich 0,14 %.

Um den Bedeckungsgrad der Elektroden zu verbessern und somit die Partikelbindung impedimetrisch messen zu können, wurde ein Durchflusssensor entwickelt. Das Arbeiten im Durchfluss bietet Vorteile, wie eine kontrollierbare und reproduzierbare Flussrate, laminare Strömung, geringe Turbulenzen und Automatisierbarkeit. Als Basis für den in dieser Arbeit gefertigten Durchflusssensor dienten Glasobjektträger. Diese wurden analog zu den 9WPtE-Chips mit einer Goldarbeits- und einer Platingegelektroden durch HF-Sputtern beschichtet. Die Elektroden des Sensorobjektträgers waren allerdings streifenförmig (siehe Abb. 51). Auf die Elektroden wurde eine Durchflussskammer (*sticky-Slide I 0.2 Luer* von ibidi) aufgeklebt. Innerhalb der Kammer betrug das Verhältnis der Flächen von Arbeits- und Gegenelektrode 1:9, ähnlich dem Verhältnis im 9WPtE-Array. Die Arbeitselektrode des Sensorobjektträgers wurde ebenfalls mit einem MUDA-SAM beschichtet. Danach wurden spezifische Antikörper durch Chemoligation mit EDC/NHS immobilisiert. Die Polystyrolpartikel wurden vor der Applikation auf den Sensor mit Antikörpern gegen die bereits auf ihrer Oberfläche vorhandenen fluoreszierenden Antikörper inkubiert. Die dafür verwendeten Antikörper dienten wiederum als Antigen für die auf dem Sensorobjektträger immobilisierten Antikörper. Dieses kompliziertere Detektionsschema (siehe Abb. 53A) sollte neben der Erhöhung der eingesetzten Partikelkonzentration dazu dienen, durch Verstärkung der Bindungskraft zwischen der Antikörperschicht auf den Elektroden und den Partikeln, den Bedeckungsgrad zu erhöhen. Die Antikörper, mit denen die Partikel vorinkubiert wurden, waren polyklonal, wodurch sie an mehrere Epitope der bereits auf den Partikeln vorhandenen Antikörper banden. Dadurch wurde die Anzahl der potentiellen Bindungspartner für die biosensorische Detektion erhöht.

Die Partikelinkubation auf den Elektroden erfolgte ruhend und danach wurde via Durchflussskammer und Pumpe Waschpuffer mit konstanter Flussrate über die Elektroden gespült, um nicht gebundene Partikel zu entfernen. Beim 9WPtE-Elektrodenarray hingegen waren diese Waschschrte jeweils mittels Pipette durchgeführt worden, wobei die mechanische Kraftein-

wirkung auf die Sensoroberfläche nur unzureichend kontrolliert und konstant gehalten werden konnte. Mit den Sensorobjektträgern wurde mikroskopisch ein Verhältnis der Partikelzahl auf den Elektroden mit spezifischen Antikörpern und den Kontrollelektroden mit unspezifischen Antikörpern von 3:1 bestimmt. Impedimetrisch wurde allerdings wie schon bei den Experimenten mit den 9WPtE-Chips kein Unterschied zwischen den Elektroden mit spezifischen Antikörpern und den Kontrollen beobachtet. Der Bedeckungsgrad für die Elektroden mit Partikeln betrug zwar bei Verwendung des spezifischen Antikörpers mit ca. 1 % mehr als beim Versuch mit den 9WPtE-Chips. Aber der Anteil unbedeckter Fläche war noch zu groß, als dass die Partikelbindung einen Einfluss auf die gemessene Impedanz hatte. Außerdem waren auf den Kontrollen mehr Partikel unspezifisch gebunden worden als beim 9WPtE-Partikelsensor. Um das Signal der Partikelbindung so weit zu verstärken, dass ein Unterschied zu den Kontrollen messbar wäre, wurde erneut die Präzipitatfällung mittels Peroxidase als Signalverstärkung angewandt. Die Partikel wurden dafür vor der Applikation auf den Sensor mit Antikörpern inkubiert, die nicht nur spezifisch für die fluoreszierenden Antikörper auf der Partikeloberfläche waren, sondern zusätzlich mit Peroxidase gekoppelt waren. Jedoch konnte auch nach zwanzigminütiger Präzipitatbildung kein Unterschied im R_{ct} zwischen den Kontrollen und den Elektroden mit den spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Ladungstransferwiderstand stieg zwar bei allen Elektroden mit der Dauer der Fällung an, aber eine dreimal höhere Partikelzahl resultierte nicht in einer stärkeren Präzipitatbildung und somit höheren Bedeckung der Elektrode und höherem R_{ct} .

Obwohl die Bindung der Polystyrolpartikel nur mikroskopisch nicht aber elektrochemisch detektiert werden konnte, wurde untersucht, ob vitale eukaryotische Zellen ebenso spezifisch an die Sensoroberfläche gebunden werden können. Als Analyt wurden Zellen der humanen Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney cell line*) verwendet. Diese Zellen waren genetisch so manipuliert, dass sie DCC-Rezeptoren (*Deleted in Colorectal Cancer*) verstärkt exprimierten und in ihre Zellmembran einbauten. Dabei befanden sich bestimmte Domänen der Rezeptoren außerhalb der Zelle und konnten durch spezifische Antikörper erkannt werden. Die korrekte DCC-Expression wurde mittels Western Blot und Immunzytochemie nachgewiesen. Der Zellbiosensor wurde basierend auf dem Sensorobjektträger aufgebaut. Analog zum Partikelsensor bestand er aus einem MUDA-SAM mit kovalent gebundenen Antikörpern, die spezifisch für die extrazellulären Epitope des DCC-Rezeptors waren. Nach Inkubation mit den Zellen wurden die Sensorobjektträger mittels Pumpe kontrolliert gespült, um nicht gebundene Zellen zu entfernen. Sowohl mikroskopisch als auch impedimetrisch waren die Elektroden, die mit den DCC-tragenden HEK293-Zellen inkubiert worden waren, ununterscheidbar von den Kontrollelektroden, die mit den HEK293-Wildtypzellen ohne DCC-Rezeptor inkubiert worden waren. Trotz der geringen Inkubationsdauer von nur 5 min und dem zehnminütigen Waschen bei einer Flussrate von 3 ml/min zeigten auch die HEK293-Zellen ohne DCC eine feste, wenn auch

unspezifische Bindung zum Biosensor. Die Färbungen mit Calcein-AM im Anschluss an die impedimetrischen Messungen belegten eine fast 100 %ige Vitalität der Zellen. Die beobachtete unspezifische Adhärenz beruhte also nicht auf Nekrose der Zellen, was zur Freisetzung von DNA und einem Verkleben der Zellen auf der Elektrode hätte führen können. Als Ursache werden vielmehr Wechselwirkungen zwischen den Zelladhäsionsmolekülen der Zellen (vor allem Integrine) und der Biosensoroberfläche angenommen. Die Zellen wurden nach der Ernte für den Biosensor zwar in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} aufbewahrt, was die Funktionalität der Integrine einschränken sollte. Allerdings konnte dies die Adhärenz nicht verhindern. Als positives Zeichen kann die hohe Vitalität der Zellen während der biosensorischen Detektion gewertet werden. Weder die 30-minütige Aufbewahrung in PBS statt in Kulturmedium, noch der Kontakt mit dem Biosensor oder die Inkubation in Messlösung hatten negative Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die 9WPtE-Elektrodenarraychips, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurden, können als Basis zum Aufbau unterschiedlichster Biosensoren dienen. Ihre vielseitige Einsetzbarkeit beruht auf der Skalierbarkeit der Arrays, auf der großen Variationsbreite an Elektrodenmaterialien, der Funktionalisierbarkeit mit dem gewünschten biologischen Erkennungsfilm und auf der Anpassungsfähigkeit an verschiedene Messtechniken. Der Array wurde im 96-*well*-Maßstab (ANSI-Standard) mit 3×3 *wells* gefertigt, kann aber in der Skalierung und *well*-Zahl modifiziert werden. So kann zum einen das 96-*well*-Format auf ein 384-*well*-Format hochskaliert werden und zum anderen kann durch Vergrößerung der Chips die tatsächliche *well*-Zahl auf 96 *wells* bzw. 384 *wells* erhöht werden. Durch die standardisierte Skalierung können die Arrays zukünftig auch für automatisierte Prozesse verwendet werden. Weitere Miniaturisierung und Parallelisierung würden sowohl einen höheren Probendurchsatz erlauben als auch eine Reduzierung der benötigten Mengen an Proben und Detektionsreagenzien. Neben der Skalierung der Chips können auch die verwendeten Materialien variiert werden. So ist es möglich, für die Arbeitselektroden statt Gold auch Indiumzinnoxid (ITO) zu verwenden. ITO kann mittels Silanen funktionalisiert werden, was andere Kopplungsstrategien für die biologischen Erkennungselemente zulassen würde. Darüber hinaus kann ITO unmittelbar auf das Borosilikatsubstrat aufgetragen werden, weil es im Vergleich zu Gold eine stabile Haftung auf Glas zeigt. Mit ITO als Material lassen sich durchsichtige Elektroden realisieren, was z. B. eine Visualisierung von auf den Elektroden gebundenen Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht. Je nach Anwendung können somit einem Baukasten gleich unterschiedliche Elektrodenzahlen, -größen und -materialien zu einem Elektrodenarray kombiniert werden. Die 9WPtE-Elektrodenarrays sind nicht nur an eine Vielzahl von Anwendungen anpassbar. Sie

können auch nach jedem Einsatz regeneriert werden, so dass mit jeder Elektrode mindestens zwanzig unterschiedliche Experimente durchgeführt werden können ohne, dass die analytische Leistung darunter leiden würde.

Der 9WPtE-Chip kann in einer Zweielektrodenkonfiguration mit Arbeits- und Gegenelektrode verwendet werden. Dies betrifft Anwendungen bei denen nur passive, dielektrische Eigenschaften von auf den Elektroden befindlichen Objekten untersucht werden, z. B. die Zellproliferation oder morphologische Veränderungen von Zellen. Sollen allerdings größere auftretende Ströme untersucht werden, wie z. B. bei der Voltammetrie oder Amperometrie, dann können die Elektrodenpaare der 9WPtE-Chips mit Referenzelektroden zu einer Dreielektrodenkonfiguration erweitert werden. Die Referenzelektroden dienen dabei der Kontrolle der an den Arbeitselektroden anliegenden Potentiale und über die Gegenelektroden fließt der Strom.

Der in dieser Arbeit erfolgreich aufgebaute Biosensor zur Detektion von Tenascin C ist ein Beleg für die Eignung der 9WPtE-Elektrodenarrays für die elektrochemische Signalwandlung biochemischer Vorgänge. Die biosensorische Detektion von Tenascin C kann auf verschiedenste andere Biomarker übertragen werden. Es können aber nicht nur die Marker detektiert werden, sondern auch geeignete biologische Erkennungselemente, z. B. spezifische Antikörper, selektiert werden. Darüber hinaus kann das Detektionsschema je nach Anwendung variiert werden. So bilden der 9WPtE-Chip und der analog dazu entwickelte Durchflusssensorobjektträger auch eine vielversprechende Basis zum Aufbau von Biosensoren für ganze eukaryotische Zellen. Diese zeigen auf den Elektroden eine hohe Vitalität, was für weitere Untersuchungen der gebundenen Zellen essentiell ist. Immunosensoren, wie die entwickelten Sensoren für TnC oder HEK293-Zellen mit DCC-Rezeptoren, leiden oft an unspezifischer Adsorption von Biomolekülen oder ganzen Zellen der Probe. Unspezifische Bindungsereignisse gewinnen vor allem bei höherer Konzentration der Moleküle oder Zellen an Bedeutung. Dies muss in zukünftigen Arbeiten adressiert werden, um die Spezifität der auf den 9WPtE-Chips und Sensorobjektträgern aufgebauten Biosensoren zu erhöhen.

6 Zusammenfassung

Ziel der Doktorarbeit war die Entwicklung und Anwendung elektrochemischer Biosensoren, mit denen herkömmliche Diagnostikverfahren erweitert oder sogar ersetzt werden können. Als Basis dafür wurden Elektrodenarraychips entworfen und gefertigt. Die als 9WPtE bezeichneten Elektrodenarrays waren aus 3×3 Elektrodenpaaren im 96-*well*-Maßstab (ANSI-Standard) aufgebaut. Jedes Elektrodenpaar bestand aus einer kreisrunden Arbeitselektrode mit einem Durchmesser von 1,9 mm und einer Gegenelektrode als offenem Kreisring um die Arbeitselektrode mit einem Durchmesser von 7 mm. Das Verhältnis der Flächen von Arbeits- und Gegenelektrode betrug 1:10. Der Array wurde im Reinraum mittels Photolithographie und Magnetronspütern auf einen Borosilikatchip mit den Maßen $49 \times 49 \times 1 \text{ mm}^3$ aufgebracht. Außerhalb des Reinraums wurden separate Messkammern und Ag/AgCl-Referenzelektroden integriert, so dass jedes Elektrodenpaar unabhängig behandelt und in einer Dreielektrodenkonfiguration gemessen werden konnte.

Sowohl das Referenzsystem als auch die Signalqualität der 9WPtE-Elektrodenarraychips wurden mittels Zyklovoltammetrie (CV), Impedanzspektroskopie und Rasterkraftmikroskopie analysiert und anhand dieser Untersuchungen optimiert. So wurde für die Messungen mit dem offenen Ag/AgCl-Referenzsystem eine Mindest-Chloridionenkonzentration im Elektrolyten von 0,1 M bestimmt. Ab dieser Konzentration und höher wurde mit den Referenzen ein stabiles Zellpotential mit Standardabweichungen vergleichbar zu kommerziell erhältlichen Elektroden gemessen. Anhand der empirisch ermittelten Zellpotentiale konnte eine theoretische Berechnungsvorschrift für die Bestimmung der Zellpotentiale bei beliebiger Chloridionenkonzentration aufgestellt werden. Damit kann zum einen der Messbereich der zykl voltammetrischen Messungen eingegrenzt werden, zum anderen können defekte Referenzen identifiziert und ausgetauscht werden. Neben der Leitsalzkonzentration hatte auch die Konzentration an Ferri-/Ferrocyanidionen einen Einfluss auf die Stabilität des Referenzsystems und auf die Signalqualität. Ferri-/Ferrocyanid diente als Redoxreagenz bei CV- und Impedanzmessungen. Die Redoxreaktion der Ionen an der Arbeitselektrode resultierte in einem messbaren Stromfluss. Ab einer Ferri-/Ferrocyanidkonzentration von 1 mM und höher wurde eine ausreichende Signalqualität für CV- und Impedanzmessungen beobachtet.

Die Produktionsbedingungen der 9WPtE-Elektrodenarraychips wurden hinsichtlich der Elektrodenqualität untersucht. Als Sputterverfahren wurde das HF-Magnetronspütern dem DC-Magnetronspütern vorgezogen, weil mittels HF glattere Oberflächen erreicht wurden. Für

den Aufbau von stabilen Biosensoren sind glatte Oberflächen als Basis essentiell. Außerdem wurden Haftvermittlerschichten aus Chrom und Indiumzinnoxid (ITO) getestet. Dabei ergab sich eine stabilere Haftung der mit ITO unterlegten Elektroden. Die Elektroden mit Chrom als Haftvermittler zeigten spätestens nach drei Recyclingprozeduren Defekte, die sie unbrauchbar machten. Zugunsten der Recycelbarkeit wurde darüber hinaus auf die Leiterbahnisolierung mit SU8-Lack verzichtet. Dies hatte trotz Flächenunterschieden von 3 % zwischen Elektroden mit geraden und solchen mit gewinkelten Leiterbahnen keinen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Elektroden und steigerte sogar die Signalstärke für die elektrochemischen Messungen. Das durch Verzicht auf die Leiterbahnisolierung mögliche Recyclen der Arbeitselektroden mit Piranha-Lösung bewirkte nur geringe Signalverluste. Dadurch konnten die Chips bis zu zwanzig Mal für den Aufbau von Biosensoren verwendet werden.

Basierend auf den 9WPtE-Elektrodenarrays sollten Immunosensoren gegen den Tumormarker Tenascin C (TnC) und gegen ganze Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 entwickelt werden. Für die Funktionalisierung der Arbeitselektroden der 9WPtE-Chips wurden sich selbst-organisierende Schichten (SAMs) aus verschiedenen Thiolen getestet. Dabei wurde das langkettige Thiol 11-Mercaptoundekansäure (MUDA) als das Thiol identifiziert, das die stabilsten SAMs bildete. An die MUDA-SAMs wurden mittels Chemoligation die biologischen Erkennungskomponenten kovalent gekoppelt. Die biologische Aktivität dieser Schichten wurde für mindestens 72 h bestätigt, was eine Biosensor-Produktion auf Vorrat ermöglicht.

Zur Detektion des Tumormarkers Tenascin C wurden drei verschiedene Strategien getestet: ein indirektes, ein *sandwich*- und ein kompetitives Verfahren. Letzteres erwies sich als das Verfahren mit der höchsten Spezifität. Durch Einsatz von Konzentrationsreihen wurde die Sensitivität des kompetitiven Biosensors für Tenascin C mit 7 µg/ml bestimmt, was bei 2 µl Probevolumen 14 ng bzw. 48 fmol der monomeren TnC-Form entsprach. Eine Minderung der analytischen Qualität wurde selbst bei bis zu zwanzig Mal recycelten Elektroden nicht beobachtet.

Mit dem 9WPtE-Chip und einem Durchflusssensor, basierend auf dem Prinzip des 9WPtE, wurde auch die Möglichkeit der Detektion ganzer eukaryotischer Zellen untersucht. Dafür wurden zuerst Polystyrolpartikel als Modellsystem verwendet. Diese wurden über Proteine, die auf ihrer Oberfläche immobilisiert waren, spezifisch an den Biosensor gebunden. Die Bindung konnte aufgrund der Fluoreszenz der Partikel mikroskopisch nachgewiesen werden, auch wenn die Partikelbindung impedimetrisch kein messbares Signal bewirkte. Bei der biosensorischen Detektion der HEK293-Zellen, die aufgrund genetischer Manipulation den Membranrezeptor DCC exprimierten, trat unspezifische Adhäsion der Zellen auf. Nichtsdestotrotz zeigten die gebundenen Zellen eine hohe Vitalität, was eine weitere Untersuchung der Zellen in zukünftigen Arbeiten ermöglichen wird.

7 Summary

Aims of the doctoral thesis were the development and the application of electrochemical biosensors to enlarge or even replace common diagnostic techniques. Therefore, electrode array chips were designed and fabricated. The so called 9WPtE electrode arrays consisted of 3×3 pairs of electrodes in a 96-well-scale (ANSI standard). Each pair of electrodes was formed by a circular working electrode with 1.9 mm in diameter surrounded by an open circular ring as counter electrode with 7 mm in diameter. The area ratio of working to counter electrode was 1:10. The array was transferred to a borosilicate substrate ($49 \times 49 \times 1 \text{ mm}^3$) by photolithography and magnetron sputtering in a clean room facility. Outside the clean room, separate measuring chambers and Ag/AgCl reference electrodes were integrated to treat each electrode pair independently and to measure in a three-electrode-configuration.

Both, the reference system and the signal quality of the 9WPtE electrode array chip were analysed via cyclic voltammetry (CV), impedance spectroscopy and atomic force microscopy for optimization. Thus, for measurements with the open Ag/AgCl reference system a minimum chloride ion concentration of 0.1 M in the electrolyte was determined. With this minimal concentration and higher ones a stable cell potential was measured with the reference electrodes showing standard deviations comparable to commercially available electrodes. On the basis of the empirical defined cell potentials a theoretical calculation method for determination of cell potentials at any chloride ion concentration was established. Therewith, the potential range in cyclic voltammetry can be determined and reference electrodes with defects can be identified and replaced. Besides the conducting salt concentration, the concentration of ferri-/ferrocyanide was influencing the stability of the reference system and the electrochemical signal quality. Ferri-/ferrocyanide served as redox compounds in CV and impedance measurements. The redox reaction of these ions at the working electrode surface results in a measurable current flow. A ferri-/ferrocyanide concentration of 1 mM and higher guaranteed a sufficient signal quality for the electrochemical measurements.

The fabrication conditions of the 9WPtE electrode array chips were investigated in terms of electrode quality. Thus, HF magnetron sputtering was preferred over DC magnetron sputtering for metal deposition because surface roughness was lower with HF. A smooth surface is in turn a prerequisite to assemble stable biosensors. Furthermore, chromium and indium tin oxide (ITO) were tested as adhesion supports with the result of a more robust adhesion of ITO supported electrodes. Electrodes with a chromium adhesion layer showed defects at the

latest after recycling them for three times which rendered the electrodes useless. In favour of recyclability, the conduction paths were not isolated with SU8 resist as usually. The resultant 3 % electrode area difference between electrodes with straight and those with angulated conductor paths had no effect on the comparability of the electrodes. Moreover, it enhanced the electrochemical signal. The recycling procedure with piranha solution caused only little loss in signal strength. Thus, the chips could be used up to twenty times for biosensor assembly.

Based on the 9WPtE electrode arrays, immunosensors against tumour marker tenascin C (TnC) and against whole cells of the human embryonic kidney cell line HEK293 should be developed. For the functionalisation of the working electrodes of the 9WPtE chip self-assembled monolayers (SAMs) of different thiols were tested. The long-chained thiol 11-mercaptoundecanoic acid (MUDA) formed the most stable SAMs. Using chemoligation, biological recognition elements were covalently coupled to the MUDA-SAMs. The biological activity of these recognition layers was confirmed for at least 72 h. Hence, a stock production of biosensors is possible.

Three different strategies were tested for the detection of tumour marker tenascin C: a direct, a sandwich and a competitive method. The latter proved to be the one with the highest specificity. Using concentration series a sensitivity of 7 $\mu\text{g/ml}$ was measured for the competitive tenascin C biosensor. This corresponds to 14 ng and 48 fmol of the monomeric form of TnC respectively. Even for up to twenty times recycled electrodes no reduction of the sensing capabilities was observed.

The detection of whole eukaryotic cells was also investigated applying the 9WPtE electrode array chip and a flow through slide chip based on the principle of the 9WPtE. First, polystyrene beads were used as model system. They were bound to the biosensor specifically via proteins immobilised on their surface. The binding event could be detected microscopically, even though an impedance-based detection was not possible. The biosensoric detection of HEK293 cells, genetically manipulated to express the DCC membrane receptor, was hindered by unspecific adherence of the cells. Nevertheless, bound cells were highly vital, which would allow further analysis of the cells in future research.

Literaturverzeichnis

- [1] THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S.: Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification: (Technical Report). In: *Pure and Applied Chemistry* 71 (1999), Nr. 12, S. 2333–2348
- [2] HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J.: Engineered antibody fragments and the rise of single domains. In: *Nature Biotechnology* 23 (2005), Nr. 9, S. 1126–1136
- [3] HAYDEN, M. S.; GILLILAND, L. K.; LEDBETTER, J. A.: Antibody engineering. In: *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), Nr. 2, S. 201–212
- [4] YIN, Z.; LIU, Y.; JIANG, L.-P.; ZHU, J.-J.: Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 5, S. 1890–1894
- [5] KOSSODO, S. d.; HOUBA, V.; GRAU, G. E.: Assaying tumor necrosis factor concentrations in human serum: A WHO International Collaborative Study. In: *Journal of Immunological Methods* 182 (1995), Nr. 1, S. 107–114
- [6] COOPER, M. A.; DULTSEV, F. N.; MINSON, T.; OSTANIN, V. P.; ABELL, C.; KLENERMAN, D.: Direct and sensitive detection of a human virus by rupture event scanning. In: *Nature Biotechnology* 19 (2001), Nr. 9, S. 833–837
- [7] WANG, R.; WANG, Y.; LASSITER, K.; LI, Y.; HARGIS, B.; TUNG, S.; BERGHMAN, L.; BOTTJE, W.: Interdigitated array microelectrode based impedance immunosensor for detection of avian influenza virus H5N1. In: *Talanta* 79 (2009), Nr. 2, S. 159–164
- [8] RUAN, C.; YANG, L.; LI, Y.: Immunobiosensor chips for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using electrochemical impedance spectroscopy. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 18, S. 4814–4820
- [9] ESCAMILLA-GÓMEZ, V.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M.: Gold screen-printed-based impedimetric immunobiosensors for direct and sensitive *Escherichia coli* quantisation. In: *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009), Nr. 11, S. 3365–3371

- [10] MANTZILA, A. G.; MAIPA, V.; PRODROMIDIS, M. I.: Development of a faradic impedimetric immunosensor for the detection of *Salmonella typhimurium* in milk. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), Nr. 4, S. 1169–1175
- [11] POURNARAS, A. V.; KORAKI, T.; PRODROMIDIS, M. I.: Development of an impedimetric immunosensor based on electropolymerized polytyramine films for the direct detection of *Salmonella typhimurium* in pure cultures of type strains and inoculated real samples. In: *Analytica Chimica Acta* 624 (2008), Nr. 2, S. 301–307
- [12] MWILU, S. K.; ALUOCH, A. O.; MILLER, S.; WONG, P.; SADIK, O. A.; FATAH, A. A.; ARCILESI, R. D.: Identification and quantitation of *Bacillus globigii* using metal enhanced electrochemical detection and capillary biosensor. In: *Analytical Chemistry* 81 (2009), Nr. 18, S. 7561–7570
- [13] EHRHART, J.-C.; BENNETAU, B.; RENAUD, L.; MADRANGE, J.-P.; THOMAS, L.; MORISOT, J.; BROSSEAU, A.; ALLANO, S.; TAUC, P.; TRAN, P.-L.: A new immunosensor for breast cancer cell detection using antibody-coated long alkylsilane self-assembled monolayers in a parallel plate flow chamber. In: *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008), Nr. 3, S. 467–474
- [14] NAGRATH, S.; SEQUIST, L. V.; MAHESWARAN, S.; BELL, D. W.; IRIMIA, D.; ULKUS, L.; SMITH, M. R.; KWAK, E. L.; DIGUMARTHY, S.; MUZIKANSKY, A.; RYAN, P.; BALIS, U. J.; TOMPKINS, R. G.; HABER, D. A.; TONER, M.: Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. In: *Nature* 450 (2007), Nr. 7173, S. 1235–1239
- [15] BALKENHOHL, T.; LISDAT, F.: An impedimetric immunosensor for the detection of autoantibodies directed against gliadins. In: *Analyst* 132 (2007), Nr. 4, S. 314–322
- [16] DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A.-M. C.; BRETT, A. M. O.: Electrochemical DNA sensors for detection of DNA damage. In: *Sensors* 5 (2005), Nr. 6, S. 377–393
- [17] FOJTA, M.: Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. In: *Electroanalysis* 14 (2002), Nr. 21, S. 1449–1463
- [18] PÄNKE, O.; KIRBS, A.; LISDAT, F.: Voltammetric detection of single base-pair mismatches and quantification of label-free target ssDNA using a competitive binding assay. In: *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007), Nr. 11, S. 2656–2662
- [19] BÄUMNER, A. J.; SCHLESINGER, N. A.; SLUTZKI, N. S.; ROMANO, J.; LEE, E. M.; MONTAGNA, R. A.: Biosensor for dengue virus detection: sensitive, rapid, and serotype specific. In: *Analytical Chemistry* 74 (2002), Nr. 6, S. 1442–1448

- [20] CULHA, M.; STOKES, D. L.; GRIFFIN, G. D.; VO-DINH, T.: Application of a miniature biochip using the molecular beacon probe in breast cancer gene BRCA1 detection. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004), Nr. 9, S. 1007–1012
- [21] TYAGI, S.; KRAMER, F. R.: Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. In: *Nature Biotechnology* 14 (1996), Nr. 3, S. 303–308
- [22] ELLINGTON, A. D.; SZOSTAK, J. W.: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. In: *Nature* 346 (1990), Nr. 6287, S. 818–822
- [23] HUA, M.; TAO, M.; WANG, P.; ZHANG, Y.; WU, Z.; CHANG, Y.; YANG, Y.: Label-free electrochemical cocaine aptasensor based on a target-inducing aptamer switching conformation. In: *Analytical Sciences* 26 (2010), Nr. 12, S. 1265–1270
- [24] SU, W.; LIN, M.; LEE, H.; CHO, M.; CHOE, W.-S.; LEE, Y.: Determination of endotoxin through an aptamer-based impedance biosensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 32 (2012), Nr. 1, S. 32–36
- [25] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, E.; SANTOS-ÁLVAREZ, N. de-los; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P.: Impedimetric aptasensor for tobramycin detection in human serum. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 5, S. 2354–2360
- [26] DEMIDOV, V. V.; POTAMAN, V. N.; FRANK-KAMENETSKIL, M. D.; EGHOLM, M.; BUCHARD, O.; SÖNNICHSEN, S. H.; NIELSEN, P. E.: Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. In: *Biochemical Pharmacology* 48 (1994), Nr. 6, S. 1310–1313
- [27] EGHOLM, M.; BUCHARDT, O.; CHRISTENSEN, L.; BEHRENS, C.; FREIER, S. M.; DRIVER, D. A.; BERG, R. H.; KIM, S. K.; NORDEN, B.; NIELSEN, P. E.: PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. In: *Nature* 365 (1993), Nr. 6446, S. 566–568
- [28] BRANDT, O.; HOHEISEL, J. D.: Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. In: *Trends in Biotechnology* 22 (2004), Nr. 12, S. 617–622
- [29] PARK, J.-Y.; LEE, Y.-s.; CHANG, B.-Y.; KIM, B. H.; JEON, S.; PARK, S.-M.: Label-free impedimetric sensor for a ribonucleic acid oligomer specific to hepatitis C virus at a self-assembled monolayer-covered electrode. In: *Analytical Chemistry* 82 (2010), Nr. 19, S. 8342–8348

- [30] WANG, J.; RIVAS, G.; CAI, X.; CHICHARRO, M.; PARRADO, C.; DONTA, N.; BEGLEITER, A.; MOWAT, M.; PALECEK, E.; NIELSEN, P. E.: Detection of point mutation in the *p53* gene using a peptide nucleic acid biosensor. In: *Analytica Chimica Acta* 344 (1997), Nr. 1–2, S. 111–118
- [31] FERIOTTO, G.; CORRADINI, R.; SFORZA, S.; BIANCHI, N.; MISCHIATI, C.; MARCHELLI, R.; GAMBARI, R.: Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. In: *Laboratory Investigation* 81 (2001), Nr. 10, S. 1415–1427
- [32] SEZGINTÜRK, M. K.: A new impedimetric biosensor utilizing VEGF receptor-1 (Flt-1): Early diagnosis of vascular endothelial growth factor in breast cancer. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 10, S. 4032–4039
- [33] WU, C.; DU, L.; WANG, D.; ZHAO, L.; WANG, P.: A biomimetic olfactory-based biosensor with high efficiency immobilization of molecular detectors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 31 (2012), Nr. 1, S. 44–48
- [34] HOFFMAN, T. L.; CANZIANI, G.; JIA, L.; RUCKER, J.; DOMS, R. W.: A biosensor assay for studying ligand-membrane receptor interactions: Binding of antibodies and HIV-1 Env to chemokine receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), Nr. 21, S. 11215–11220
- [35] HALVERSON, K. M.; PANCHAL, R. G.; NGUYEN, T. L.; GUSSIO, R.; LITTLE, S. F.; MISAKIAN, M.; BAVARI, S.; KASIANOWICZ, J. J.: Anthrax biosensor, protective antigen ion channel asymmetric blockade. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), Nr. 40, S. 34056–34062
- [36] OLIVEIRA, M. D. L.; CORREIA, M. T. S.; DINIZ, F. B.: Concanavalin A and polyvinyl butyral use as a potential dengue electrochemical biosensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009), Nr. 4, S. 728–732
- [37] LA BELLE, J. T.; GERLACH, J. Q.; SVAROVSKY, S.; JOSHI, L.: Label-free impedimetric detection of glycan–lectin interactions. In: *Analytical Chemistry* 79 (2007), Nr. 18, S. 6959–6964
- [38] LI, J.; JIANG, F.; WEI, X.: Molecularly imprinted sensor based on an enzyme amplifier for ultratrace oxytetracycline determination. In: *Analytical Chemistry* 82 (2010), Nr. 14, S. 6074–6078

- [39] YANG, Y.; YI, C.; LUO, J.; LIU, R.; LIU, J.; JIANG, J.; LIU, X.: Glucose sensors based on electrodeposition of molecularly imprinted polymeric micelles: A novel strategy for MIP sensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 5, S. 2607–2612
- [40] MANO, N.; HELLER, A.: Detection of glucose at 2 fM concentration. In: *Analytical Chemistry* 77 (2004), Nr. 2, S. 729–732
- [41] GRASSINO, A. N.; MILARDOVIĆ, S.; GRABARIĆ, Z.; GRABARIĆ, B. S.: Amperometric assessment of glucose electrode behaviour in mixed solvents and determination of glucose in dairy products. In: *Food Chemistry* 125 (2011), Nr. 4, S. 1335–1339
- [42] SHERVEDANI, R. K.; MEHRJARDI, A. H.; ZAMIRI, N.: A novel method for glucose determination based on electrochemical impedance spectroscopy using glucose oxidase self-assembled biosensor. In: *Bioelectrochemistry* 69 (2006), Nr. 2, S. 201–208
- [43] BARHOUMI, H.; MAAREF, A.; RAMMAH, M.; MARTELET, C.; JAFFREZIC, N.; MOUSTY, C.; VIAL, S.; FORANO, C.: Urea biosensor based on Zn₃Al–Urease layered double hydroxides nanohybrid coated on insulated silicon structures. In: *Materials Science and Engineering: C* 26 (2006), Nr. 2–3, S. 328–333
- [44] MISHRA, R. K.; DOMINGUEZ, R. B.; BHAND, S.; MUÑOZ, R.; MARTY, J.-L.: A novel automated flow-based biosensor for the determination of organophosphate pesticides in milk. In: *Biosensors and Bioelectronics* (2011)
- [45] NIWA, O.; KURITA, R.; HORIUCHI, T.; TORIMITSU, K.: Small-volume on-line sensor for continuous measurement of γ -aminobutyric acid. In: *Analytical Chemistry* 70 (1998), Nr. 1, S. 89–93
- [46] ANDRIEUX, C. P.; LIMOGES, B.; SAVÉANT, J.-M.; YAZIDI, D.: Cyclic voltammetric responses of horseradish peroxidase multilayers on electrodes. In: *Langmuir* 22 (2006), Nr. 25, S. 10807–10815
- [47] LEI, Y.; MULCHANDANI, P.; WANG, J.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.: Highly sensitive and selective amperometric microbial biosensor for direct determination of p-nitrophenyl-substituted organophosphate nerve agents. In: *Environmental Science & Technology* 39 (2005), Nr. 22, S. 8853–8857
- [48] MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; WANG, J.; CHEN, L.: Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphorus hydrolase. In: *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001), Nr. 7–8, S. 433–437

- [49] URBAN, A.; ECKERMANN, S.; FAST, B.; METZGER, S.; GEHLING, M.; ZIEGELBAUER, K.; RÜBSAMEN-WAIGMANN, H.; FREIBERG, C.: Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery. In: *Applied and Environmental Microbiology* 73 (2007), Nr. 20, S. 6436–6443
- [50] LEHMANN, M.; RIEDEL, K.; ADLER, K.; KUNZE, G.: Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 15 (2000), Nr. 3–4, S. 211–219
- [51] KLOSS, D.; FISCHER, M.; ROTHERMEL, A.; SIMON, J. C.; ROBITZKI, A. A.: Drug testing on 3D in vitro tissues trapped on a microcavity chip. In: *Lab on a Chip* 8 (2008), Nr. 6
- [52] BANERJEE, P.; BHUNIA, A. K.: Cell-based biosensor for rapid screening of pathogens and toxins. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010), Nr. 1, S. 99–106
- [53] WOLF, P.; ROTHERMEL, A.; BECK-SICKINGER, A. G.; ROBITZKI, A. A.: Microelectrode chip based real time monitoring of vital MCF-7 mamma carcinoma cells by impedance spectroscopy. In: *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2008), Nr. 2, S. 253–259
- [54] ROTHERMEL, A.; KURZ, R.; RUFFER, M.; WEIGEL, W.; JAHNKE, H.-G.; SEDELLO, A. K.; STEPAN, H.; FABER, R.; SCHULZE-FORSTER, K.; ROBITZKI, A. A.: Cells on a chip—the use of electric properties for highly sensitive monitoring of blood-derived factors involved in angiotensin II type 1 receptor signalling. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 16 (2005), Nr. 1-3, S. 51–58
- [55] ROTHERMEL, A.; NIEBER, M.; MÜLLER, J.; WOLF, P.; SCHMIDT, M.; ROBITZKI, A. A.: Real-time measurement of PMA-induced cellular alterations by microelectrode array-based impedance spectroscopy. In: *BioTechniques* 41 (2006), Nr. 4, S. 445–450
- [56] PÄNKE, O.; WEIGEL, W.; SCHMIDT, S.; STEUDE, A.; ROBITZKI, A. A.: A cell-based impedance assay for monitoring transient receptor potential (TRP) ion channel activity. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 5, S. 2376–2382
- [57] SOMMERHAGE, F.; BAUMANN, A.; WROBEL, G.; INGEBRANDT, S.; OFFENHÄUSSER, A.: Extracellular recording of glycine receptor chloride channel activity as a prototype for biohybrid sensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010), Nr. 1, S. 155–161
- [58] GEBINOĞA, M.; MAI, P.; DONAHUE, M.; KITTLER, M.; CIMALLA, I.; LÜBBERS, B.; KLETT, M.; LEBEDEV, V.; SILVEIRA, L.; SINGH, S.; SCHÖBER, A.: Nerve cell response to inhibitors recorded with an aluminum–galliumnitride/galliumnitride field-effect transistor. In: *Journal of Neuroscience Methods* 206 (2012), Nr. 2, S. 195–199

- [59] HAAS, S.; JAHNKE, H.-G.; GLASS, M.; AZENDORF, R.; SCHMIDT, S.; ROBITZKI, A. A.: Real-time monitoring of relaxation and contractility of smooth muscle cells on a novel biohybrid chip. In: *Lab on a Chip* 10 (2010), Nr. 21
- [60] JAHNKE, H.-G.; ROTHERMEL, A.; STERNBERGER, I.; MACK, T. G. A.; KURZ, R. G.; PÄNKE, O.; STRIGGOW, F.; ROBITZKI, A. A.: An impedimetric microelectrode-based array sensor for label-free detection of tau hyperphosphorylation in human cells. In: *Lab on a Chip* 9 (2009), Nr. 10
- [61] JAHNKE, H.-G.; BRÄSIGK, A.; MACK, T. G. A.; PÖNICK, S.; STRIGGOW, F.; ROBITZKI, A. A.: Impedance spectroscopy based measurement system for quantitative and label-free real-time monitoring of tauopathy in hippocampal slice cultures. In: *Biosensors and Bioelectronics* 32 (2012), Nr. 1, S. 250–258
- [62] ZHANG, X.; LIU, F.; YAN, R.; XUE, P.; LI, Y.; CHEN, L.; SONG, C.; LIU, C.; JIN, B.; ZHANG, Z.; YANG, K.: An ultrasensitive immunosensor array for determination of staphylococcal enterotoxin B. In: *Talanta* 85 (2011), Nr. 2, S. 1070–1074
- [63] PENG, H.-I.; STROHSAHL, C. M.; MILLER, B. L.: Microfluidic nanoplasmonic-enabled device for multiplex DNA detection. In: *Lab on a Chip* (2012)
- [64] DACRES, H.; WANG, J.; LEITCH, V.; HORNE, I.; ANDERSON, A. R.; TROWELL, S. C.: Greatly enhanced detection of a volatile ligand at femtomolar levels using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). In: *Biosensors and Bioelectronics* 29 (2011), Nr. 1, S. 119–124
- [65] LIU, C.-H.; TSENG, W.-L.: Oxidase-functionalized Fe_3O_4 nanoparticles for fluorescence sensing of specific substrate. In: *Analytica Chimica Acta* 703 (2011), Nr. 1, S. 87–93
- [66] PATTNAIK, P.: Surface plasmon resonance. In: *Applied Biochemistry and Biotechnology* 126 (2005), Nr. 2, S. 79–92
- [67] BALKENHOHL, T.; BEUTLER, F.; SCHÄFER, D.; LISDAT, F.: Entwicklung eines impedimetrischen Biosensors für den Nachweis von Antigliadin Autoantikörpern. In: UNGVÁRI, L. (Hrsg.): *Wissenschaftliche Beiträge*. Berlin: Verlag News & Media Marcus von Amsberg, 2007, S. 48–57
- [68] BHAVSAR, K.; FAIRCHILD, A.; ALONAS, E.; BISHOP, D. K.; LA BELLE, J. T.; SWEENEY, J.; ALFORD, T. L.; JOSHI, L.: A cytokine immunosensor for Multiple Sclerosis detection based upon label-free electrochemical impedance spectroscopy using electroplated printed circuit board electrodes. In: *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009), Nr. 2, S. 506–509

- [69] DARAIN, F.; PARK, D.-S.; PARK, J.-S.; SHIM, Y.-B.: Development of an immunosensor for the detection of vitellogenin using impedance. In: *Biosensors and Bioelectronics* 19 (2004), Nr. 10, S. 1245–1252
- [70] LIU, X.; DUCKWORTH, P. A.; WONG, D. K. Y.: Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010), Nr. 6, S. 1467–1473
- [71] DARAIN, F.; PARK, D.-S.; PARK, J.-S.; CHANG, S.-C.; SHIM, Y.-B.: A separation-free amperometric immunosensor for vitellogenin based on screen-printed carbon arrays modified with a conductive polymer. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), Nr. 9, S. 1780–1787
- [72] TAG, K.; RIEDEL, K.; BAUER, H.-J.; HANKE, G.; BARONIAN, K. H. R.; KUNZE, G.: Amperometric detection of Cu^{2+} by yeast biosensors using flow injection analysis (FIA). In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 122 (2007), Nr. 2, S. 403–409
- [73] KISNER, A.; STOCKMANN, R.; JANSEN, M.; YEGIN, U.; OFFENHÄUSSER, A.; KUBOTA, L. T.; MOURZINA, Y.: Sensing small neurotransmitter–enzyme interaction with nanoporous gated ion-sensitive field effect transistors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 31 (2012), Nr. 1, S. 157–163
- [74] SUBRAMANIAN, S.; ASCHENBACH, K. H.; EVANGELISTA, J. P.; NAJJAR, M. B.; SONG, W.; GOMEZ, R. D.: Rapid, sensitive and label-free detection of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 using carbon nanotube biosensors. In: *Biosensors and Bioelectronics* 32 (2012), Nr. 1, S. 69–75
- [75] ISHIGE, Y.; SHIMODA, M.; KAMAHORI, M.: Extended-gate FET-based enzyme sensor with ferrocenyl-alkanethiol modified gold sensing electrode. In: *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009), Nr. 5, S. 1096–1102
- [76] MISHRA, G. K.; MISHRA, R. K.; BHAND, S.: Flow injection analysis biosensor for urea analysis in adulterated milk using enzyme thermistor. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010), Nr. 4, S. 1560–1564
- [77] SCHOLZ, F. (Hrsg.): *Electroanalytical methods: Guide to experiments and applications*. 2. korrigierter Druck. Berlin: Springer, 2005. – ISBN 3540422293
- [78] KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R.: Cyclic voltammetry. In: *Journal of Chemical Education* 60 (1983), Nr. 9, S. 702–706

- [79] PÄNKE, O.; BALKENHOHL, T.; KAFKA, J.; SCHÄFER, D.; LISDAT, F.: Impedance spectroscopy and biosensing. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 109 (2008), S. 195–237
- [80] RANGLES, J. E. B.: Kinetics of rapid electrode reactions. In: *Discussions of the Faraday Society* 1 (1947)
- [81] LISDAT, F.; SCHÄFER, D.: The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. In: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008), Nr. 5, S. 1555–1567
- [82] WONG, L. S.; KHAN, F.; MICKLEFIELD, J.: Selective covalent protein immobilization: strategies and applications. In: *Chemical Reviews* 109 (2009), Nr. 9, S. 4025–4053
- [83] BAIN, C. D.; TROUGHTON, E. B.; TAO, Y.-T.; EVALL, J.; WHITESIDES, G. M.; NUZZO, R. G.: Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. In: *Journal of the American Chemical Society* 111 (1989), Nr. 1, S. 321–335
- [84] NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L.: Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. In: *Journal of the American Chemical Society* 105 (1983), Nr. 13, S. 4481–4483
- [85] CHEN, Y.-X.; TRIOLA, G.; WALDMANN, H.: Bioorthogonal chemistry for site-specific labeling and surface immobilization of proteins. In: *Accounts of Chemical Research* 44 (2011), Nr. 9, S. 762–773
- [86] GÖPEL, W.; HEIDUSCHKA, P.: Interface analysis in biosensor design. In: *Biosensors and Bioelectronics* 10 (1995), Nr. 9-10, S. 853–883
- [87] TAXIS DU POET, P. d.; MIYAMOTO, S.; MURAKAMI, T.; KIMURA, J.; KARUBE, I.: Direct electron transfer with glucose oxidase immobilized in an electropolymerized poly(N-methylpyrrole) film on a gold microelectrode. In: *Analytica Chimica Acta* 235 (1990), Nr. 0, S. 255–263
- [88] YABUKI, S.: Polyelectrolyte complex membranes for immobilizing biomolecules, and their applications to bio-analysis. In: *Analytical Sciences* 27 (2011), Nr. 7, S. 695
- [89] PATOLSKY, F.; LICHTENSTEIN, A.; WILLNER, I.: Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. In: *Nature Biotechnology* 19 (2001), Nr. 3, S. 253–257
- [90] LIU, G.-D.; WU, Z.-Y.; WANG, S.-P.; SHEN, G.-L.; YU, R.-Q.: Renewable amperometric immunosensor for *Schistosoma japonicum* antibody assay. In: *Analytical Chemistry* 73 (2001), Nr. 14, S. 3219–3226

- [91] WALTER, A.; WU, J.; FLECHSIG, G.-U.; HAAKE, D. A.; WANG, J.: Redox cycling amplified electrochemical detection of DNA hybridization: Application to pathogen *E. coli* bacterial RNA. In: *Analytica Chimica Acta* 689 (2011), Nr. 1, S. 29–33
- [92] WITTENBERG, N. J.; HAYNES, C. L.: Using nanoparticles to push the limits of detection. In: *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 1 (2009), Nr. 2, S. 237–254
- [93] KIM, D.-J.; LEE, N.-E.; PARK, J.-S.; PARK, I.-J.; KIM, J.-G.; CHO, H. J.: Organic electrochemical transistor based immunosensor for prostate specific antigen (PSA) detection using gold nanoparticles for signal amplification. In: *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010), Nr. 11, S. 2477–2482
- [94] JONES, F. S.; HOFFMAN, S.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAN, G. M.: A detailed structural model of cytotactin: protein homologies, alternative RNA splicing, and binding regions. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989), Nr. 6, S. 1905–1909
- [95] JONES, P. L.; JONES, F. S.: Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. In: *Matrix Biology* 19 (2000), Nr. 7, S. 581–596
- [96] JOESTER, A.; FAISSNER, A.: The structure and function of tenascins in the nervous system. In: *Matrix Biology* 20 (2001), Nr. 1, S. 13–22
- [97] JONES, F. S.; JONES, P. L.: The tenascin family of ECM glycoproteins: Structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. In: *Developmental Dynamics* 218 (2000), Nr. 2, S. 235–259
- [98] CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M.: Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. In: *Journal of Pathology* 200 (2003), Nr. 4, S. 488–499
- [99] OREND, G.; CHIQUET-EHRISMANN, R.: Tenascin-C induced signaling in cancer. In: *Cancer Letters* 244 (2006), Nr. 2, S. 143–163
- [100] HEROLD-MENDE, C.; MÜLLER, M. M.; BONSANTO, M. M.; SCHMITT, H. P.; KUNZE, S.; STEINER, H.-H.: Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. In: *International Journal of Cancer* 98 (2002), Nr. 3, S. 362–369
- [101] FEARON, E. R.; CHO, K. R.; NIGRO, J. M.; KERN, S. E.; SIMONS, J. W.; RUPPERT, J. M.; HAMILTON, S. R.; PREISINGER, A. C.; THOMAS, G.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B.: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. In: *Science* 247 (1990), Nr. 4938, S. 49–56

- [102] MEHLEN, P.; FEARON, E. R.: Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. In: *Journal of Clinical Oncology* 22 (2004), Nr. 16, S. 3420–3428
- [103] HONG, K.; HINCK, L.; NISHIYAMA, M.; POO, M.-m.; TESSIER-LAVIGNE, M.; STEIN, E.: A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. In: *Cell* 97 (1999), Nr. 7, S. 927–941
- [104] CORSET, V.; NGUYEN-BA-CHARVET, K. T.; FORCET, C.; MOYSE, E.; CHEDOTAL, A.; MEHLEN, P.: Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor. In: *Nature* 407 (2000), Nr. 6805, S. 747–750
- [105] STEIN, E.; TESSIER-LAVIGNE, M.: Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. In: *Science* 291 (2001), Nr. 5510, S. 1928–1938
- [106] KEINO-MASU, K.; MASU, M.; HINCK, L.; LEONARDO, E. D.; CHAN, S. S.-Y.; CULOTTI, J. G.; TESSIER-LAVIGNE, M.: Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. In: *Cell* 87 (1996), Nr. 2, S. 175–185
- [107] FORCET, C.; YE, X.; GRANGER, L.; CORSET, V.; SHIN, H.; BREDESEN, D. E.; MEHLEN, P.: The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (2001), Nr. 6, S. 3416–3421
- [108] RIBAUT, C.; REYBIER, K.; TORBIERO, B.; LAUNAY, J.; VALENTIN, A.; REYNES, O.; FABRE, P.-L.; NEPVEU, F.: Strategy of red blood cells immobilisation onto a gold electrode: Characterization by electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. In: *Ingénierie et Recherche Biomédicale* 29 (2008), Nr. 2-3, S. 141–148
- [109] KATO, K.; TODA, M.; IWATA, H.: Antibody arrays for quantitative immunophenotyping. In: *Biomaterials* 28 (2007), Nr. 6, S. 1289–1297
- [110] KAMP, V. t.: *Etablierung eines eukaryotischen Expressionssystems für neurotrophe Faktoren*, Universität Leipzig, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Institut für Biochemie, Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik, Diplomarbeit, 24. 09. 2009
- [111] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry* 72 (1976), Nr. 1–2, S. 248–254

- [112] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R.: *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*. 2. New York [u.a.]: Wiley, 2001. – ISBN 0–471–04372–9
- [113] HAYNES, W. M. (Hrsg.); LIDE, D. R. (Hrsg.): *CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemical and physical data: 2011-2012*. 92nd. Boca Raton: CRC, op. 2011. – ISBN 978–1439855119
- [114] FRAGOSO, A.; LABORIA, N.; LATTA, D.; O’SULLIVAN, C. K.: Electron permeable self-assembled monolayers of dithiolated aromatic scaffolds on gold for biosensor applications. In: *Analytical Chemistry* 80 (2008), Nr. 7, S. 2556–2563
- [115] HASHIMOTO, K.; ITO, K.; ISHIMORI, Y.: Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. In: *Analytical Chemistry* 66 (1994), Nr. 21, S. 3830–3833
- [116] REZAEI, B.; MAJIDI, N.; RAHMANI, H.; KHAYAMIAN, T.: Electrochemical impedimetric immunosensor for insulin like growth factor-1 using specific monoclonal antibody-nanogold modified electrode. In: *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2011), Nr. 5, S. 2130–2134
- [117] DYKSTRA, P. H.; ROY, V.; BYRD, C.; BENTLEY, W. E.; GHODSSI, R.: Microfluidic electrochemical sensor array for characterizing protein interactions with various functionalized surfaces. In: *Analytical Chemistry* 83 (2011), Nr. 15, S. 5920–5927
- [118] DAVIES, C. W.: *Ion association*. Washington: Butterworths, 1962
- [119] DRON, J.; DODI, A.: Thermodynamic modeling of Cl^- , NO_3^- and SO_4^{2-} removal by an anion exchange resin and comparison with Dubinin-Astakhov isotherms. In: *Langmuir* 27 (2011), Nr. 6, S. 2625–2633
- [120] NIELSEN, A. M.; SPANJERS, H.; VOLCKE, E. I. P.: Calculating pH in pig manure taking into account ionic strength. In: *Water Science and Technology* 57 (2008), Nr. 11, S. 1785–1790
- [121] ZHANG, H.-L.; HAN, S.-J.: Viscosity and density of water + sodium chloride + potassium chloride solutions at 298.15 K. In: *Journal of Chemical & Engineering Data* 41 (1996), Nr. 3, S. 516–520
- [122] HORNIBROOK, W. J.; JANZ, G. J.; GORDON, A. R.: The thermodynamics of aqueous solutions of potassium chloride at temperatures from 15–45° from E. m. f. measurements on cells with transference. In: *Journal of the American Chemical Society* 64 (1942), Nr. 3, S. 513–516

- [123] MARQUES, A.; FERRA, M. I. A.; BANDEIRA, M. H.: Activity coefficients of potassium chloride in aqueous solutions of potassium chloride and potassium phthalate. In: *Portugaliae Electrochemica Acta* (2006), Nr. 2, S. 295–303
- [124] FRIIS, E. P.; ANDERSEN, J. E. T.; MADSEN, L. L.; BONANDER, N.; MØLLER, P.; ULSTRUP, J.: Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its Cys3Ser mutant at single-crystal gold surfaces investigated by cyclic voltammetry and atomic force microscopy. In: *Electrochimica Acta* 43 (1998), Nr. 9, S. 1114–1122
- [125] MEITES, L.: *Handbook of analytical chemistry*. McGraw-Hill, 1963 (McGraw-Hill handbooks)
- [126] SAWYER, D. T.; SOBKOWIAK, A.; ROBERTS, J. L.: *Electrochemistry for chemists*. Wiley, 1995 (Wiley-Interscience publication). – ISBN 9780471594680
- [127] SZABÓ, S.; BAKOS, I.: Reference electrodes in metal corrosion. In: *International Journal of Corrosion* 2010 (2010), S. 1–20
- [128] BATES, R. G.; MACASKILL, J. B.: Standard potential of the silver-silver chloride electrode. In: *Pure and Applied Chemistry* 50 (1978), Nr. 11-12, S. 1701–1706
- [129] ROBINSON, R. A.; STOKES, R. H.: *Electrolyte solutions: The measurement and interpretation of conductance, chemical potential, and diffusion in solutions of simple electrolytes*. 2. London: Butterworths, 1965, reprinted 1970. – ISBN 0408184906
- [130] MALATESTA, F.; GIACOMELLI, A.; ZAMBONI, R.: Activity coefficients of electrolytes from the emf of liquid membrane cells. III: LaCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, and $\text{LaFe}(\text{CN})_6$. In: *Journal of Solution Chemistry* 23 (1994), Nr. 1, S. 11–36
- [131] MURRAY, R. C. J.; ROCK, P. A.: The determination of the ferrocyanide-ferricyanide standard electrode potential at 25 °C in cells without liquid junction using cation-sensitive glass electrodes. In: *Electrochimica Acta* 13 (1968), Nr. 4, S. 969–975
- [132] KERNER, W.; KIWIT, M.; LINKE, B.; KECK, F. S.; ZIER, H.; PFEIFFER, E. F.: The function of a hydrogen peroxide-detecting electroenzymatic glucose electrode is markedly impaired in human sub-cutaneous tissue and plasma. In: *Biosensors and Bioelectronics* 8 (1993), Nr. 9–10, S. 473–482
- [133] OLSCHESKI, H.; ERLINKÖTTER, A.; ZABOROSCH, C.; CHEMNITIUS, G.-C.: Screen-printed enzyme sensors for l-lysine determination. In: *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000), Nr. 7, S. 537–543

- [134] TAN, Y.; CHU, X.; SHEN, G.-L.; YU, R.-Q.: A signal-amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B₁ determination in rice. In: *Analytical Biochemistry* 387 (2009), Nr. 1, S. 82–86
- [135] PARK, M.; LEE, W.; LEE, J. G.; LEE, C.: A comparison of the mechanical properties of RF- and DC- sputter-deposited Cr thin films. In: *Materials Science Forum* 546-549 (2007), S. 1695–1698
- [136] SCHULER, L. P.; ALKAISI, M. M.; MILLER, P.; REEVES, R. J.; MARKWITZ, A.: Comparison of DC and RF sputtered zinc oxide films with post-annealing and dry etching and effect on crystal composition. In: *Japanese Journal of Applied Physics* 44 (2005), Nr. 10, S. 7555–7560
- [137] STELZLE, M.; WEISSMÜLLER, G.; SACKMANN, E.: On the application of supported bilayers as receptive layers for biosensors with electrical detection. In: *Journal of Physical Chemistry* 97 (1993), Nr. 12, S. 2974–2981
- [138] LAIBINIS, P. E.; WHITESIDES, G. M.; ALLARA, D. L.; TAO, Y.-T.; PARIKH, A. N.; NUZZO, R. G.: Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, Cu, Ag, Au. In: *Journal of the American Chemical Society* 113 (1991), Nr. 19, S. 7152–7167
- [139] LOVE, J. C.; ESTROFF, L. A.; KRIEBEL, J. K.; NUZZO, R. G.; WHITESIDES, G. M.: Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. In: *Chemical Reviews* 105 (2005), Nr. 4, S. 1103–1169
- [140] HINES, M. A.; TODD, J. A.; GUYOT-SIONNEST, P.: Conformation of alkanethiols on Au, Ag(111), and Pt(111) electrodes: A vibrational spectroscopy study. In: *Langmuir* 11 (1995), Nr. 2, S. 493–497
- [141] LAIHO, T.; LEIRO, J. A.: ToF-SIMS study of 1-dodecanethiol adsorption on Au, Ag, Cu and Pt surfaces. In: *Surface and Interface Analysis* 40 (2008), Nr. 1, S. 51–59
- [142] LAIHO, T.; LUKKARI, J.; MERETOJA, M.; LAAJALEHTO, K.; KANKARE, J.; LEIRO, J. A.: Chemisorption of alkyl thiols and S-alkyl thiosulfates on Pt(111) and polycrystalline platinum surfaces. In: *Surface Science* 584 (2005), Nr. 1, S. 83–89
- [143] LIN, D. S.: The adhesion of metal films to glass and magnesium oxide in tangential shear. In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 4 (1971), Nr. 12, S. 1977
- [144] MATTOX, D. M.: Influence of oxygen on the adherence of gold films to oxide substrates. In: *Journal of Applied Physics* 37 (1966), Nr. 9, S. 3613

- [145] HOOGVLIET, J. C.; BENNEKOM, W. P.: Gold thin-film electrodes: an EQCM study of the influence of chromium and titanium adhesion layers on the response. In: *Electrochimica Acta* 47 (2001), Nr. 4, S. 599–611
- [146] MOULTON, S. E.; BARISCI, J. N.; BATH, A.; STELLA, R.; WALLACE, G. G.: Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions. In: *Electrochimica Acta* 49 (2004), Nr. 24, S. 4223–4230
- [147] REZAEI, B.; KHAYAMIAN, T.; MAJIDI, N.; RAHMANI, H.: Immobilization of specific monoclonal antibody on Au nanoparticles for hGH detection by electrochemical impedance spectroscopy. In: *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2009), Nr. 2, S. 395–399
- [148] ERSÖZ, A.; DENIZLI, A.; ÖZCAN, A.; SAY, R.: Molecularly imprinted ligand-exchange recognition assay of glucose by quartz crystal microbalance. In: *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005), Nr. 11, S. 2197–2202
- [149] BALASUBRAMANIAN, S.; REVZIN, A.; SIMONIAN, A.: Electrochemical desorption of proteins from gold electrode surface. In: *Electroanalysis* 18 (2006), Nr. 19-20, S. 1885–1892
- [150] FISCHER, D.; CURIONI, A.; ANDREONI, W.: Decanethiols on gold: The structure of self-assembled monolayers unraveled with computer simulations. In: *Langmuir* 19 (2003), Nr. 9, S. 3567–3571
- [151] HEISTER, K.; ZHARNIKOV, M.; GRUNZE, M.; JOHANSSON, L. S. O.: Adsorption of alkanethiols and biphenylthiols on Au and Ag substrates: A high-resolution X-ray photoelectron spectroscopy study. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 105 (2001), Nr. 19, S. 4058–4061
- [152] SCHWARTZ, D. K.: Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. In: *Annual Review of Physical Chemistry* 52 (2001), S. 107–137
- [153] KODOYIANNI, V.: Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging. In: *BioTechniques* 50 (2011), Nr. 1, S. 32–40
- [154] NUZZO, R. G.; ZEGARSKI, B. R.; DUBOIS, L. H.: Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on Au(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (1987), Nr. 3, S. 733–740
- [155] PORTER, M. D.; BRIGHT, T. B.; ALLARA, D. L.; CHIDSEY, C. E. D.: Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers

- on gold by optical ellipsometry, infrared-spectroscopy, and electrochemistry. In: *Journal of the American Chemical Society* 109 (1987), Nr. 12, S. 3559–3568
- [156] ITO, E.; KONNO, K.; NOH, J.; KANAI, K.; OUCHI, Y.; SEKI, K.; HARA, M.: Chain length dependence of adsorption structure of COOH-terminated alkanethiol SAMs on Au(111). In: *Applied Surface Science* 244 (2005), Nr. 1-4, S. 584–587
- [157] JENNINGS, G. K.; MUNRO, J. C.; YONG, T.-H.; LAIBINIS, P. E.: Effect of chain length on the protection of copper by n-alkanethiols. In: *Langmuir* 14 (1998), Nr. 21, S. 6130–6139
- [158] YOON, H. C.; YANG, H.; BYUN, S. Y.: Ferritin immunosensing on microfabricated electrodes based on the integration of immunoprecipitation and electrochemical signaling reactions. In: *Analytical Sciences* 20 (2004), Nr. 9, S. 1249–1253
- [159] YOSHIDA, J.; WAKABAYASHI, T.; OKAMOTO, S.; KIMURA, S.; WASHIZU, K.; KIYOSAWA, K.; MOKUNO, K.: Tenascin in cerebrospinal fluid is a useful biomarker for the diagnosis of brain tumour. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 57 (1994), Nr. 10, S. 1212–1215
- [160] DUECK, M.; RIEDL, S.; HINZ, U.; TANDARA, A.; MÖLLER, P.; HERFARTH, C.; FAISSNER, A.: Detection of tenascin-C isoforms in colorectal mucosa, ulcerative colitis, carcinomas and liver metastases. In: *International Journal of Cancer* 82 (1999), Nr. 4, S. 477–483
- [161] RIEDL, S.; BODENMÜLLER, H.; HINZ, U.; HOLLE, R.; MÖLLER, P.; SCHLAG, P.; HERFARTH, C.; FAISSNER, A.: Significance of tenascin serum level as tumor marker in primary colorectal carcinoma. In: *International Journal of Cancer* 64 (1995), Nr. 1, S. 65–69
- [162] ROPERS, T.; KROLL, W.; BECKA, M.; VOELKER, M.; BURCHARDT, Elmar R.; SCHUPPAN, D.; GEHRMANN, M.: Enzyme immunoassay for the measurement of human tenascin-C on the Bayer Immuno 1TM analyzer. In: *Clinical Biochemistry* 33 (2000), Nr. 1, S. 7–13
- [163] YLÄTUPA, S.; MERTANIEMI, P.; HAGLUND, C.; PARTANEN, P.: Enzyme immunoassay for quantification of tenascin in biologic samples. In: *Clinical Biochemistry* 28 (1995), Nr. 3, S. 263–268
- [164] KERMAN, K.; KRAATZ, H.-B.: Electrochemical probing of HIV enzymes using ferrocene-conjugated peptides on surfaces. In: *Analyst* 134 (2009), Nr. 12, S. 2400–2404
- [165] KIRCHHOFF, G. R.: Ueber den Durchgang eines elektrischen Stromes durch eine Ebene, insbesondere durch eine kreisförmige. In: *Annalen der Physik* 140 (1845), Nr. 4, S. 497–514

Anhang

Vektorkarte des pVITRO2-hygro-mcs (InvivoGen) mit DCC-eCFP-Konstrukt:

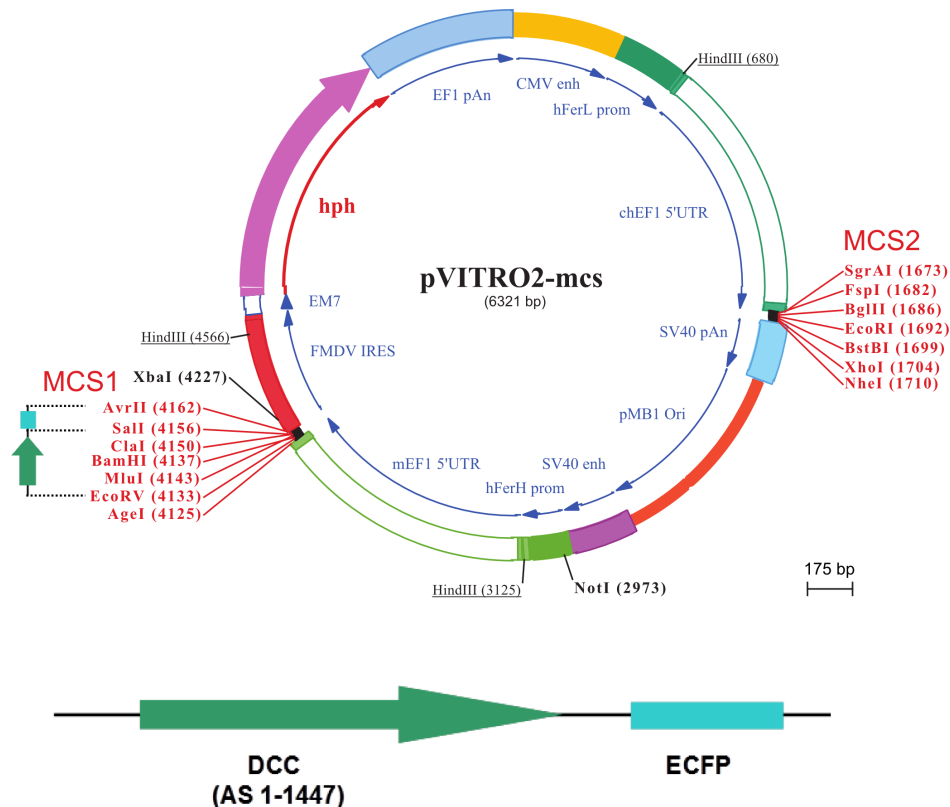


Abbildung 59: Vektorkarte des pVITRO2-hygro-mcs von InvivoGen mit der Sequenz für das DCC-eCFP-Fusionsprotein. Als Vektor wurde pVITRO2-hygro-mcs von InvivoGen verwendet (Vektorkarte und Sequenz von www.invivogen.com/PDF/pVITR02_h_mcs_TDS1.pdf). Das Konstrukt aus DCC (Aminosäuren 1-1447) und dem Fluoreszenzprotein eCFP wurde in die multiple Klonierungsstelle 1 (MCS1) des pVITRO2-hygro-mcs-Plasmids zwischen den Restriktionsschnittstellen für *EcoRV* und *AvrII* inkloniert. Die Klonierungsprimer für DCC wurden nach dem Eintrag CAA59786.1 in der Datenbank *European Nucleotide Archive* (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/CAA59786) konstruiert und die klonierte Sequenz wurde mittels Kompletsequenzierung überprüft. Die Sequenz für das eCFP wurde aus dem Vektor pECFP-N1 von Clontech Laboratories, Inc. isoliert. Auf dem pVITRO2-hygro-mcs befanden sich außer dem DCC-eCFP-Konstrukt ein Hygromycin-B-Resistenzgen, eukaryotische Promotoren (hFerH prom und hFerL prom), ein bakterieller Promotor (EM7), verschiedene Sequenzen zur Verstärkung der Genexpression (SV40 enh, CMV enh), Polyadenylierungssignale (SV40 pAn, EF1 pAn), ein Replikationsursprung (pMB1 Ori), die interne ribosomale Eintrittsstelle des Maul- und Klauenseuche Virus (FMDV IRES), die 5'-untranslatierten Regionen des Elongationsfaktors 1 von Schimpanse und Maus (chEF1 5'UTR, mEF1 5'UTR), eine weitere multiple Klonierungsstelle (MCS2) und Restriktionsschnittstellen außerhalb der MCS (*HindIII*, *NotI*). Der Vektor besitzt ohne das DCC-eCFP-Konstrukt 6321 Basenpaare (bp). Die Skalierung ist in bp angegeben.

Sequenz des pVITRO2-hygro-mcs (www.invivogen.com/PDF/pVITRO2_h_mcs_TDS1.pdf) mit DCC-Sequenz aus *European Nucleotide Archive* (www.ebi.ac.uk/ena/data/view/CAA59786) und eCFP-Sequenz aus Vektor pECFP-N1 von Clontech Laboratories, Inc.:

EcoRV - **DCC** - **SalI** - **eCFP** - **AvrII**

```
CCTGCAGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGAAGTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGATGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGTAGTACAGGGCCCCAACCCCCCAAGCCCCATTTACAACACGCTGGCGCTACAGGCGCGTGACTTCCCTTGCCTTGGGGCGGGGGCTGAGACTCCTATGTGCTCCGATTGGTCAGGCACGGCCTTCGGCCCCCTCTGCCACCGCAGATTGGCCGCTAGGCCTCCCCGAGCGCCCTGCCTCCGAGGGCCGGCGCACCATAAAAGAAGCCGCCCTAGCCACGTCCCCTCGCAGTTCGGCGGTCCCGCGGGTCTGTCTCAAGCTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCTGGCCTCTTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGACCTTGAATTACTTCCATGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTGATCCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGCTTGAAGTGGAGCCTGGCTGGGGCGTGGGGCCGCGCGTGCTAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTTCGCTAAGTCTCTAGCCATTTAAATTTTTGATAACAGCTGCGACGCTTTTTTTTGGCGAGATAGTCTTTGAAATGCGGGCCAGGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTGCGCGAGGCGGGGCCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAATGGCCGGCTGCTCTGGTGCTGGCCTCGCGCCCGCTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGCAAGGCTGGCCCCGTGGCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGTTCCCGGCCCTGCTGACGGGAGCTCAAATGGAGGACGCGCGCCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTTTCCTTCCCTCATCCGCTCGCTTATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTGTGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATCTCCTTGAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGCCTCATTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCAATTCAGGTGCTGTAAGAACTACCCCTAAAGCCACCGCGTGCGCAAGATCTGAATCTTCGAACTCGAGGCTAGCTGGCCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAAACAAGTTAAACAACAACATTCGATTCAATTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTTGATGGAATGTTAATTAAGTAGCCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTGACACCCCTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTAGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGTACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGGCGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCTGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGCTGCTCATATGTTCTAATTAACCTGCAGGGCCTGAAATAACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTTAGGTACCTTCTGAGGCTGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTGAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGATCCCCAAGCAGGCAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCACTAGTTCGCCCAGAGCGCGCAGGGCCTCCAGCGCCGCCCTCCCCACAGCAGGGGCGGGGTCCCGCGCCACCGGAAGGAGCGGGCTCGGGGCGGGCGGCGCTGATTGGCCGGGGCGGGCTGACGCCGACGCGGCTATAAGAGACCACAAGCGACCCGAGGGCCAGACGTTCTTCGCCGAAGCTTGCCGTGAGAAGCAGGTGAGGGGCGGGTGTGCTTCCGCGGGCCGCCGAGCTGGAGGTCTGCTCCGAGCGGGCCGGGCCCGCTGTCGTGCGCGGGATTAGCTGCGAGCATTTCCGCTTCGAGTTGCGGGCGGCGCGGGAGGCAGAGTGCGAGGCTAGCGGAACCCCGTAGCCTCGCCTCGTGCCGCTTGAAGCCTAGCGTGGTGTCCGCGCCGCCCGCGCTGCTACTCCGGCCACTCTGGTCTTTTTTTTTTTTGTGTTGTGTTGCCCCGTGCTGCTTTCGATTGCCGTTTCAAGTATAGGGGCTAACAAGGGAGGGTGGCGGCTTGTGCCCCGAGCGCGGAGAGGTATGTTGGGGAGGAATGGAGGGACAGAGTGGCGGCTGGGGCCGCCGCCCTTCGGAGCACATGTCGACGCCACCTGGATGGGGCGAGGCTGGGGTTTTTCCGAAGCAACAGGCTGGGGTTAGCGTGCCGAGGCCATGTGGCCCCAGCACCCGACGATCTGGCTTGGCGCGCGCGCTTGCCCTGCCTCCCTAAGTGGGTGAGGCCATCCCGTCCGGCACCACTTGGTGTGCTGGAAAGATGGCCGCTCCCGGGCCCTGTTGCAAGGAGCTCAAATGGAGGACGCGCGACCCCGTGGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAGAGGGCTGGTCCCTCACCGGCTGCTGCTTCCGTGACCCCGTGGTCCATCGGCCGAATAGTCACCTCGGGCTTTTGTAGCACGGCTAGTCGCGCGGGGGAGGGGATGTAATGGCGTTGGAGTTTGTTCACATTTGGTGGGTGGAGACTAGTCAGGCCAGCCTGGCGCTGGAAGTCATTTTTGAATTTGTCCCTTGAGTTTGAAGCGAGCTAATCTCGGGCTTCTAGCGGTTCAAAGGTATCTTTTAAACCTTTTTTAGGTGTTGTGAAAACACCGCTAATTCAAAGCAACCGGTATATCATGAGGATACAGTGTACTTAAGTGTGAAGTCATTGGGGAACCCATGCC
```

ACAATACACTGGCAGAAAAATCAACAAGACCTCAACCCACTCCCAGGAGACTCGCGTGTGGTCTTGCCCTCCGGAGCATTGCAGATT
AGCCGACTTCAGCCAGGAGACAGTGGAGTCTACAGATGCTCGGCTCGGAATCCAGCCAGCATAAGAACAGGAAATGAAGCAGAAATTAGAA
TTTTATCAGACCCAGGCCATAGGCAGCTATATTTCTGCAGAGACCATCCAACGTAATAGCCATTGAAGGGAAAGATGCTGTCTCGGA
GTGCTGTGTTCTGGCTATCCTCCGCCAAGTTTCACCTGGTTACGAGGCGAGGAGGTCATCCAACCTCAGGCTCTAAAAAGTATTTCATTGTTG
GGTGAAGCAATTTGCTCATCTCTAATGTGACAGATGATGACAGTGAACCTATACTTGCCTGTGCACCTATAAGAATGAGAATATTAGTG
CCTCTGCAGAGCTCACGGTCTTGGTTCGGCCCTGGTTTTTAAATCACCCCTCCAACCTCTATGCCTATGAGAGCATGGATATTGAGTTTGA
ATGTGCAGTTTCTGGGAAGCCTGTGCCACTGTGAATTGGATGAAGAATGGAGATGTGGTATCCCGAGTGACTATTTTCAGATAGTGGGA
GGAAGCAACTTACGGATCCTTGGGGTGGTCAAGTCAGATGAAGGCTTCTATCAATGTGTGGCTGAAAATGAGGCTGGCAATGCCCAAAGTA
GTGCCCAGCTGATTGTCCCAAGCCTGCCATCCCAAGCTCCAGCATCCTCCCTTCTGCTCCCAGAGATGTGCTCCCTGTCTTGGTTTTCTAG
TCGCTTTTCCGTTTGAGCTGGCGTCCACCTGCAGAAGCAAAAGGGAACATTCAAACCTTCACAGTCTTTTCTCCAGAGAGGGTGACAAAC
AGGGAGCGAGCTTTGAATACAACCCAGCCTGGGTCCCTTCAGCTTACTGTGGGAACTTGAAACCAGAAGCCATGTACACCTTCAGAGTTG
TCGCTTACAATGAGTGGGGACAGGGGAGAGTTCTCAGCCCATCAAGGTGGCCACTCAGCCTGAGTTGCAAGTTCCAGGGCCAGTAGAAAA
CCTGCATGCTGTATCTACCTCACCTACCTCAATTCTTATTACATGGGAACCCCTGCCTATGCAAAATGGCCAGTCCAAGTTACAGATTG
TTCTGCAGCTGAGGTGTCTACAGGAAAAGAACAGAATATAGAGGTTGATGGACTATCTTATAAACTGGAAGGCCTGAAAAAATTACAGGAAT
ATACTCTTCGATTCTAGCTTATAATCGTTATGGGCCAGGAGTATCTACTGATGATATAACAGTTGTTACACTTTTCAGACGTGCCAAGTGC
TCCACCTCAGAACATCTCACTGGAAGTGGTTAACTCAAGGAGTATCAAAGTAAGCTGGCTCCCTCCTCCATCGGGAACACAAAATGGATTT
ATTACTGGCTATAAAATTCGACACAGAAAGACTACCCGACAGGGGCGAGATGAAACACTGGAACCGAATAACCTCTGGTACCTCTTCACAG
GATTGGAGAAAGGCAGTCAGTACAGTTTCCAAGTGTCCGGCCATGACAGTCAATGGTACTGGACCACCTTCCAACCTGGTACACAGCGGAGAC
CCAGAGAATGATTTAGATGAGTCTCAAGTCCCTGACCAGCCGAGTTCTCTTCACGTGAGGCCCCAGACAACTGTATCATCATGAGTTGG
ACACCTCCTCTAACCCAAACATCGTGGTGAGAGGCTATATTATTGGCTATGGTGTGGCAGTCTTATGCTGAAACAGTGCCTGTGGACA
GTAAGCAGCTGTAATTTCCATCGAGAGACTAGAGTCGAGTTCTCATTATGTAATCTCCTTAAAGCTTTCAACAATGCCGCGAGGTGT
CCCTCTCTACGAAAGTGCCACCACCTCGTTCCATAACAGATCCCACTGACCCCGTTGATTATATTATCCTTTGCTTGATGATTTCCCCACCTCG
GGCCAGATGTCTCCACCCCATGCTCCACCCAGTAGGTGTACAGGCTGTGGCTCTTACCCATGAGGCTGTGAGGGTCAGCTGGGCAGACA
ACTCTGTCCCGAAGAACAGAAAACATCCGATGTGCGACTGTACACCGTTCCGTTGGAGGACCAGCTTTTCTGCCAGTGCCAAGTACAAGTC
AGAAGACACAACATCTCTCAGTTACACAGCGACTGGCCTCAAGCCCAATACCATGTACGAGTTCTCAGTCATGGTGACCAAGAACAGAAGG
TCAAGCAGCTGGAGCATGACTGCACACGCCACCCTACGAAGCTGCCCAACTTCTGCTCCCAAGGATCTGACAGTCATTACTCGAGAGG
GGAAGCCTCGTGCTGTCTATTGTGAGCTGGCAGCCTCCCTTGGAAGCCAATGGGAAAATCACTGCTTATATCTTGTTTTATACATTGGACAA
GAATATACCAATAGATGATTGGATTATGGAACATATCAGCGGTGACCGGCTTACCCATCAGATCATGGATCTCAGCCTTGACACGATGTAT
TACTTTTCAATTCAAGCAGGAATGTGAAAGGAGTAGGGCCCTCTCTGATCCCATCCTCTTCAGGACTTTGAAAGTGGAACACCCCTGACA
AAATGGCTAATGCAAGTTCGTCTGAGATGGGGGTTATTGGCCAGTTGATGATACTAACTTGATTGATAGGAAGCACTCTCAACGAAACCC
CATTGGACAGATGCACCCCGCATGGCAGTGTCACTCCTCAGAAGAACAGCAACCTGCTTGTAATAACCGTGGTCACCGTTGGTGTCTC
ACTGTGTTGGTCTGGTGATTGTAGCAGTGAATTTGCACCCGGCGTTCTTCAGCGCAGCAGAGGAAGAAACGGGCCACACAGTGGTAGCA
AGAGGAAGGGCAGTCAGAAAGACCTCCGGCTCCCGATCTTTGGATACATCATGAAGAAATGGAATGAAAAATATCGAGAAGCCTACGGG
AACCGACCTGCAGGAAGAGACTCCCCATCCAGAGCTGCCAAGATCTCACACCAGTCAGCCATAGCCAGTCAGAAACCCAGATGGGAAGC
AAAAGTGCTCTCATTACAGGTGAGGACACTGAGGACGCGAGGAGCTCCATGTCCACTTTGGAACCGTCCCTGGCAGCACGCCGGGCCACCA
GGGCCAAGCTCATGATTCCCATGGAGGCCAGTCCAGTAATCCTGCTGTTGTGAGTGCCATCCCTGTACCAACACTAGAAAGTGCCAGTA
TCCAGGAATCCTCCTGATCTCCACATGTTGGATACCCGATCCAGACTTCACTCTCCGGCCAGTACCATTGAAACAGCTGTCTGTGGACCGA
GGTTTTGGAGCAGGAAGAACTCAGTCTGTGAGTGAAGGACCAACCAGCAACAGCAACCCATGCTGCCCCAGCTCAGCCCGAACATCCGA
GCAGTGAAGAAGCACCCAGTAGAACCATCCCCACAGCCTGTGTGCGGCCAACTCATCCACTCCGCAGCTTTGCTAACCCATTACTACCTCC
ACCCATGAGTGCAATAGAACCAAAAGTCCCTTACACACCGCTTTTGTCTCAGCCAGGACCCACCCTTCCCAAGACTCATGTTAAACGGCC
TCCCTTGGGCTGGCCGGAAGGCAGGTCCCTTTGCTTCCCGTGTCTGTGCCAACAGCCCTGAAGTGTCTGAGGAGAGCCACAAGCCCA
CAGAGGATCCAGCCAGTGTATATGAACAGGATGACTTGAGCGAACAATGGCAAGTTTGGAAGGGCTAATGAAGCAACTCAACGCCATCAC
AGGCTCAGCCTTTGTGAGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGAC
GTAAACGGCCACAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGGCA
AGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTGGGCGGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTG
AAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGT
ACAACATACATCAGCCACAACGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGA
CGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGCAGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACC
CAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGG
ACGAGCTGTACAAGTAACCTAGCAGAGGTTTCCCAATGACACAAAACGTGCAACTTGAAACTCCGCCTGGTCTTTTCAGGTCTAGAGGG
GTAACACTTTGTACTGCGTTTGGCTCCACGCTCGATCCACTGGCGAGTGTAGTAACAGCACTGTTGCTTCGTAGCGGAGCATGACGGCCG
TGGAACACTCCTCCTTGGTAACAAGGACCCACGGGGCCAAAAGCCACGCGCCACACGGGCCCGTCATGTGTGCAACCCAGCAGCGGCACTTT
ACTGCGAAACCCACTTTAAAGTGACATTGAAACTGGTACCCACACACTGGTGACAGGCTAAGGATGCCCTTCAGGTACCCCGAGGTAACAC
GCGACACTCGGGATCTGAGAAGGGGACTGGGGCTTCTATAAAAGCGCTCGGTTTAAAAAGCTTCTATGCCTGAATAGGTGACCGGAGGTG
GCACCTTTCTTTGCAATTACTGACCCTATGAATACAACACTGACTGTTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACG
ACTCACTATAGGAGGGCCACCATGAAGAAACCTGAACTGACAGCAACTTCTGTTGAGAAGTTCTCATTGAAAAATTGATTCTGTTTCTG
ATCTCATGCAGCTGTCTGAAGGTGAAGAAAGCAGAGCCTTTTCTTTTGTGTTGGAGGAAGAGGTTATGTTCTGAGGGTCAATTCTTGTGCT
TGATGGTTTTTACAAGACAGATATGTTTACAGACACTTTGCCCTGCTGCTCTGCCAATTCAGAAGTTCTGGACATTGGAGAATTTTCT

GAATCTCTCACCTACTGCATCAGCAGAAGAGCACAAAGGAGTCACTCTCCAGGATCTCCCTGAAACTGAGCTGCCAGCTGTTCTGCAACCTG
TTGCTGAAGCAATGGATGCCATTGCAGCAGCTGATCTGAGCCAAACCTCTGGATTTGGTCCTTTTGGTCCCAAGGCATTGGTCAGTACAC
CACTTGGAGGGATTTCATTTGTGCCATTGCTGATCCTCATGTCTATCACTGGCAGACTGTGATGGATGACACAGTTTCTGCTTCTGTTGCT
CAGGCACTGGATGAACTCATGCTGTGGGCAGAAGATTGTCCTGAAGTGAGACACCTGGTCCATGCTGATTTTGGAAAGCAACAATGTTCTGA
CAGACAATGGCAGAATCACTGCAGTCATTGACTGGTCTGAAGCCATGTTTTGGAGATTCTCAATATGAGGTTGCCAACATTTTTTTTTGGAG
ACCTTGGCTGGCTTGCATGGAACAACAAACAAGATATTTTGAAAGAAGACACCCAGAACTGGCTGGTTCCCCCAGACTGAGAGCCTACATG
CTCAGAATTGGCCTGGACCAACTGTATCAATCTCTGGTTGATGAAACTTTGATGATGCTGCTTGGGCACAAGGAAGATGTGATGCCATTG
TGAGGTCTGGTGTGGAAGTGTGGAAGAACTCAAATTGCAAGAAGGTCTGCTGCTGTTTGGACTGATGGATGTGTTGAAGTTCTGGCTGA
CTCTGGAACAGGAGACCCTCCACAAGACCCAGAGCCAAGGAATGAATATTAGCTAGATTATCCCTAATACCTGCCACCCCACTCTTAATC
AGTGGTGGAGAAGCGGTCTCAGAACTGTTTGTTCATTTGGCCATTTAAGTTTAGTAGTAAAAGACTGGTTAATGATAACAATGCATCGTA
AAACCTTCAGAAGGAAAGGAGAATGTTTTGTGGACCACTTTGGTTTTCTTTTTTGGCGTGTGGCAGTTTTAAGTTATTAGTTTTTAAATCA
GTACTTTTTTAATGAAACAACCTTGACCAAAAATTTGTCACAGAATTTTGAGACCCATTAAAAAGTTAAATGAGAACTGTGTGTTTCCTT
TGGTCAACACCGAGACATTTAGGTGAAAGACATCTAATTTCTGGTTTTACGAATCTGGAACCTTCTTGAAAATGTAATTTCTTGAGTTAACAC
TTCTGGGTGGAGAATAGGGTTGTTTTCCCCCACATAATTGGAAGGGGAAGGAATATCATTTAAAGCTATGGGAGGGTTGCTTTGATTACA
ACACTGGAGAGAAATGCAGCATGTTGCTGATTGCCTGTCACTAAACAGGCCAAAAACTGAGTCCTTGGGTTCATAGAAAGCTG

(Alle URLs im Anhang wurden am 04. 09. 2012 geprüft.)

Danksagung

„Knowledge is the only competitive advantage of our times, it grows through open interaction with others.“

(Ronald Coase *1910)

Mein herzlichster Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Robitzki für die Bereitstellung dieses interessanten Forschungsthemas. Ich danke ihr für die Betreuung der Promotion und für die Möglichkeit, in einem exzellent ausgestatteten Labor zu arbeiten. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Joachim Wegener für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. Oliver Pänke aussprechen, der mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt hat. Ich konnte auf sein fachliches Wissen und seine Einsatzbereitschaft zählen, auch über die Arbeitszeit hinaus. Ebenso danke ich Sabine Schmidt für die Unterstützung bei der Chipentwicklung und Ronny Azendorf für die Anfertigung des Chip-Adapters.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die fachliche und moralische Unterstützung und die Hilfsbereitschaft. Winnie Weigel, Nadja Ney und Tamara Friedriszik danke ich für die organisatorische Unterstützung inner- und außerhalb des Labors. Ein großer Dank geht an meine Kolleginnen aus der 5. Etage, mit denen ich diese besondere Zeit durchleben durfte.

Ich danke hier auch den Menschen, die mich außerhalb der Arbeitsgruppe unterstützt haben: meinen Eltern, meinem Bruder, meinen Großeltern und Freunden. Danke, dass ihr die ganze Zeit hinter mir standet.

Christoph, dir danke ich besonders für die Unterstützung in den schweren Stunden dieser Unternehmung und dass du immer von mir überzeugt bist.

Lebenslauf

Name	Anja Steude
geboren	25.06.1984 in Eilenburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
1995-1997	Albert-Schweitzer-Gymnasium Bad Dübén
1997-2003	Martin-Rinckart-Gymnasium Eilenburg
2003	Abitur
2003-2008	Studium der Biochemie an der Universität Leipzig, Abschluss Dipl. Biochem. mit Note „sehr gut“
08-09/2006	Projektarbeit am Heritage Medical Research Center in Edmonton bei Prof. Ballanyi
10/2006-07/2007	studentische Hilfskraft am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung Leipzig
10/2007-03/2008	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe für Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik, BBZ, Universität Leipzig unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Andrea Robitzki; „RNA-Interferenz basierte Untersuchungen zur Rolle von Dicer während der Netzhautentwicklung“
seit 04/2008	Promotion in der Arbeitsgruppe für Molekularbiologisch-biochemische Prozesstechnik, BBZ, Universität Leipzig unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Andrea Robitzki; „Entwicklung elektrochemischer Biosensoren für die Tumordiagnostik“
2008-2011	DFG Stipendium, Graduiertenschule BuildMoNa
04-08/2011	wissenschaftlicher Mitarbeiter im EXIST-Transferprojekt „Bioelektronische Hochdurchsatz-Screeningsysteme“
05-07 und 09/2012	wissenschaftliche Hilfskraft im Life Science Entrepreneurship Office Leipzig

Publikationen

Steude A., Schmidt S., Robitzki A. A. und Pänke O., *An electrode array for electrochemical immuno-sensing using the example of impedimetric tenascin C detection*. Lab Chip, 2011, Volume 11/17, 2884-2892

Pänke O., Weigel W., Schmidt S., Steude A. und Robitzki A. A., *A cell-based impedance assay for monitoring transient receptor potential (TRP) ion channel activity*. Biosensors and Bioelectronics 2011, Volume 26/5, 2376-2382

Vorträge

Steude A., *RNA Interferenz basierte Untersuchungen zur Rolle von Dicer während der Netzhautentwicklung*. BBZ Doktorandenkolloquium (02. 07. 2008)

Steude A., Pänke O., Schmidt S. und Robitzki A. A., *Development of novel antibody-based biosensors for specific immobilisation and detection of cells*. 2nd BuildMoNa Workshop for Doctoral Candidates 2009

Steude A., Pänke O., Schmidt S. und Robitzki A. A., *Development and fabrication of multielectrode arrays for immuno-assisted whole cell detection systems*. World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2009, München; IFMBE Proceedings, 2009, Volume 25/8, 153-156

Steude A., *Entwicklung elektrochemischer Biosensoren für die Tumordiagnostik*. BBZ Doktorandenkolloquium (09. 05. 2012)

Poster

Steude A., Pänke O., Schmidt S., Nieber M. und Robitzki A. A., *Development and fabrication of novel protein-based biosensors for neuronal diagnostics*. 7th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2008, ISBN 3-9810760-4-4, S. 72

Steude A., Pänke O., Schmidt S. und Robitzki A. A., *Development and fabrication of a novel protein-based biosensor for specific detection and immobilisation of cells*. Scientific Symposium of the Graduate School BuildMoNa 2009

Steude A., Pänke O., Schmidt S., Nieber M. und Robitzki A. A., *Development and fabrication of novel biosensors for immuno-assisted whole cell detection*. Saxon Biotechnology Symposium 2009, ISBN 978-3-00-027884-6, S. 231

Steude A., Pänke O., Schmidt S. und Robitzki A. A., *Assembly of an antibody-based electrochemical biosensor for whole cell detection*. 8th Leipzig Research Festival for Life Sciences 2009, ISBN 3-9810760-5-2, S. 93

Steude A., Pänke O., Schmidt S. und Robitzki A. A., *Whole-cell-detection biosensors based on multielectrode arrays*. Scientific Symposium of the Graduate School BuildMoNa 2010

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe und dass ich die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit als solche kenntlich gemacht habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht.

Leipzig, den 11.09.2012

Anja Steude